

**Reifungsbedingte Membranveränderungen an Eberspermien und deren
Bedeutung für die Kältesensitivität der Spermien**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom Biophysikerin Ulrike Sandra Jakop, geb. Bley

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, PhD

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Thomas Günther-Pomorski

2. Prof. Dr. Andreas Herrmann

3. PD Dr. habil. Jürgen Schiller

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Mai 2013

Zusammenfassung

Lipide und Proteine besitzen eine heterogene laterale Verteilung in Zellmembranen. Spezifische Lipide und Proteine werden dabei in speziellen Membrandomänen angereichert, die in verschiedenen räumlichen und zeitlichen Dimensionen existieren können. Spermien, die keine aktive Proteinbiosynthese betreiben, haben durch eine Umorganisation solcher Membrandomänen die Möglichkeit, auf die unterschiedlichen Anforderungen auf ihrem Weg vom Hoden bis zur Eizelle zu reagieren.

Um diese Membrandynamik in Säugerspermien zu untersuchen, wurden aus Eberspermien detergenzresistente Membrandomänen (DRMs) isoliert. Die Analyse der DRMs aus Spermien unterschiedlicher Regionen des Nebenhodens und von Ejakulatspermien sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit sich Membraneigenschaften während der Reifungsprozesse verändern. Zusätzlich wurden DRMs aus Eberspermien untersucht, die sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Lagerung bei 4°C unterscheiden. Dies sollte aufklären, ob es einen Zusammenhang zwischen der Kälteempfindlichkeit der Spermien und der Zusammensetzung ihrer DRMs gibt.

In ersten Versuchen wurde Triton-X 100 aus neun verschiedenen Detergenzien für die Isolierung von DRMs aus Eberspermien ausgewählt, da es in Verbindung mit einer mechanischen Lyse essentielle Bereiche der Zell- und Akrosomenmembran von den Zellen löst. Analog zu publizierten Daten anderer Autoren wurden ausschließlich aus den mit Triton-X 100 und mechanisch behandelten Spermien in einem Saccharosedichtegradienten sichtbare opaleszente Banden erhalten, die einen erhöhten Anteil an Sphingomyelin (SM), Phosphatidylinositol (PI) und Cholesterol besaßen.

Die Analyse von DRMs aus Spermien unterschiedlicher Reifestadien zeigte bereits in den Dichtegradienten reproduzierbar unterschiedliche Bandenmuster bei Spermien aus den verschiedenen Nebenhodenabschnitten und nach Seminalplasmakontakt. Mit zunehmender Reifung stieg die Dichte, bei der die opaleszenten Banden auftraten. Bereits dies ließ Veränderungen der DRMs und der damit in Zusammenhang stehenden Membraneigenschaften im Laufe der Reifung vermuten. Beim Vergleich der DRM-Zusammensetzung ließ sich im Laufe der Reifung eine Erhöhung des relativen Anteils an Glycerophosphatidylethanolamin (GPE) und PI an den Glycerophospholipiden feststellen. Der relative Anteil an SM verhielt sich gegenläufig dazu und nahm während der Reifung im

Nebenhoden und nach Seminalplasmakontakt in den DRMs der Spermien ab. Das Verhältnis von Lipid- zu Proteingehalt in den DRMs sank nach Seminalplasmakontakt. Die Zunahme an GPE und die Abnahme an SM deuten auf eine Destabilisierung möglicher Membrandomänen hin. Dies könnte in Vorbereitung auf die Kapazitation und Akrosomenreaktion der Spermien geschehen, und die beschriebene Zusammenlagerung von kleinen Membrandomänen zu größeren Clustern begünstigen. Zunächst wird die Spermienmembran mit den destabilisierten Membrandomänen jedoch wahrscheinlich durch die Proteine des Seminalplasmas geschützt, die sich nach der Ejakulation an der Spermienmembran anlagern. Für eine Aufnahme neuer Proteine, beispielsweise mit einem GPI-Anker, in die Membrandomänen, spricht die beobachtete Anreicherung des PIs in den DRMs. Die Aufnahme und Anlagerung von Proteinen sorgte vermutlich auch für die Verringerung des Verhältnisses von Lipid zu Protein in den DRMs der Spermien nach Seminalplasmakontakt. Durch die *in vitro* Inkubation von Nebenhodenspermien aus der Cauda mit Seminalplasma, das aus Ejakulaten nach Separation von den Originalspermien gewonnen wurde, konnten jedoch nicht die gleichen Veränderungen hervorgerufen werden, denen die Spermien-DRMs während der Ejakulation *in vivo* unterworfen waren.

Eberspermien sind generell kälteempfindlich und reagieren auf die Lagerung bei niedrigen Temperaturen selbst oberhalb des Gefrierpunktes mit einer deutlichen Reduzierung ihrer Motilität. Daher findet ihre Lagerung üblicherweise bei 16°C unter Zusatz von Verdünnermedien statt. Um das bei dieser Temperatur zu erwartende Keimwachstum zu minimieren, werden diesen Verdünnermedien Antibiotika zugesetzt. Im Hinblick auf die steigende Zahl an Keimen mit Antibiotikaresistenzen wäre eine Reduzierung oder Vermeidung der Antibiotika durch die Absenkung der Lagerungstemperatur wünschenswert.

Spermien von 64 Ebern einer Eberstation wurden hinsichtlich ihrer Kälteresistenz untersucht, indem Aliquots ihrer Ejakulate parallel bei 16°C und 4°C gelagert wurden. Die Spermien von nur etwa 10% der Eber erwiesen sich als kälteresistent, d. h. ihre Motilität unterschied sich kaum zwischen beiden Lagerungstemperaturen. Diese Eigenschaft ist individuum-spezifisch. Von Ebern mit kälteresistenten und kältesensitiven Spermien wurde die Zusammensetzung der Spermien-DRMs untersucht. In der ³¹P-NMR-Analyse zeigten die DRMs von kälteresistenten Spermien einen erhöhten Anteil an Glycerophosphatidylcholin-Plasmalogenen und einen verringerten Anteil an Diacylphosphatidylcholin. Da die Plasmalogene in Eberspermien eher langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäurereste gebunden haben und an die Diacylphosphatidylcholine eher kurze,

gesättigte Fettsäurereste gebunden sind, könnte dies darauf hindeuten, dass für die Kälteresistenz ein höherer Anteil von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäureresten in den DRMs von Vorteil ist. Dies ließ sich in einer MALDI-TOF MS Analyse bestätigen, bei der die DRMs von kälteresistenten Eberspermien einen geringeren Anteil an kurzen gesättigten Fettsäureresten besaßen. Der erhöhte Anteil an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäureresten könnte in den DRMs die Membranfluidität erhöhen und so die Zellmembran bei niedrigen Temperaturen besser funktionsfähig erhalten. Ob diese Eigenschaften mit der Befruchtungsfähigkeit der Eberspermien interferieren, bleibt in künftigen Arbeiten zu klären.

Summary

The lateral distribution of lipids and proteins in cell membranes is heterogeneous. Therefore, certain lipids and proteins are enriched in specific domains of varying size and different time scales. In transcriptional inactive cells like spermatozoa, a remodeling of those domains provides one possibility to respond to the multiple challenges on their way to fertilization.

To investigate membrane dynamics in mammalian spermatozoa detergent resistant membrane domains (DRMs) were investigated in boar spermatozoa at various developmental stages. DRMs of spermatozoa from different epididymal regions as well as ejaculates should reflect changes in membrane properties during maturation. Whether there is a linkage between resistance of boar spermatozoa to storage at 4°C and the composition of their DRMs was also analyzed.

Following initial experiments with nine differing detergents, Triton-X 100 was selected as the detergent most suitable for further experiments, because it releases, in combination with mechanical stress, essential parts of the plasma membrane and acrosome membrane from the cell. In analogy to the literature, exclusively after exposure to Triton-X 100 and mechanical treatment, sharp opalescent bands could be revealed in a sucrose density gradient that were enriched in sphingomyelin (SM), phosphatidylinositol (PI) and cholesterol.

The comparison of DRMs from sperm cells at varying epididymal stages with ejaculated spermatozoa showed various characteristic band patterns in the sucrose density gradients. This suggests changes in membrane properties related to DRMs of spermatozoa during their passage of the epididymis and after contact to seminal fluid. Upon maturation and ejaculation, an increase of the relative content of glycerophosphatidylethanolamine (GPE) and PI within glycerophospholipids was observed in the DRMs. The relative amount of SM decreased in DRMs during maturation and after contact to seminal fluid. Further, the ratio of lipid to protein content was reduced in the DRMS after contact to seminal fluid. Increasing GPE and decreasing SM amounts suggest a destabilization of DRMs and therefore destabilization of possible membrane domains in maturing sperm cells as a prerequisite to capacitation and acrosome reaction. This could lead at later stage to the described clustering, i. e. formation of larger membrane domains, during capacitation in advance to acrosome reaction. First, however, seminal fluid proteins cover the spermatozoa protecting the membrane with the destabilized membrane domains. The rise in the DRMs PI content may be an indication for

the introduction of new proteins with a GPI-anchor. The insertion and attachment of proteins might also be responsible for the observed decrease of the lipid to protein ratio in DRMs during ejaculation. An incubation of epididymal spermatozoa from the cauda with seminal fluid, collected by separation from ejaculated spermatozoa, did not generate the observed changes in the sperm DRMs during ejaculation *in vivo*.

Spermatozoa from boars are sensitive to storage at cold temperatures even above the freezing point. Therefore, sperm conservation for artificial insemination is performed at 16°C in the presence of antibiotics. A reduced storage temperature is a prerequisite to decrease the usage of antibiotics which is a must considering the rising resistances. A screening of the ejaculates from 64 boars resulted in about 10% of the individuals whose spermatozoa maintained their quality during storage at 4°C. Repeated analysis of ejaculates of eight selected boars revealed that resistance to cold storage is an individual property. DRM composition between cold sensitive and cold resistant sperm was compared. ³¹P-NMR analysis indicated a reduced content of diacylphosphatidylcholines and an enriched content of glycerophosphocholine-plasmalogens in the DRMs of cold resistant sperm. This was accompanied by a higher content of long-chained polyunsaturated fatty acid, as boar sperm plasmalogens predominantly contain long-chain polyunsaturated fatty acyl residues and diacylphosphatidylcholines exhibit shorter rather saturated fatty acyl residues. This was confirmed by MALDI-TOF MS where the cold resistant sperm had reduced contents of saturated fatty acyl residues in the phospholipids of their DRMs. The higher content of long-chained polyunsaturated residues in the DRMs could raise membrane's fluidity and therefore help the sperm's membrane to withstand deeper temperatures. It remains to be investigated whether this property of boar spermatozoa interferes with their fertilizing capability.

Inhalt

1. Abkürzungsverzeichnis	9
2. Einleitung	13
2.1 Das Spermium – eine spezialisierte Zelle im Auftrag der Reproduktion.....	13
2.2 Asymmetrischer Aufbau von Zellmembranen	14
2.3 (Membran-)Veränderungen bei Spermien im Rahmen der Reifung – der Weg vom Hoden bis zur Eizelle	25
2.4 (Membran-)veränderungen bei Spermien durch Einflussfaktoren bei künstlichen Reproduktionstechniken.....	32
2.5 Charakteristika von DRMs in Säugerspermien	35
2.6 Ergebnisse der Vorversuche des Projektes	35
2.7 Ziele dieser Studie	38
3. Material und Methoden	40
3.1 Material.....	40
3.1.1 Verwendete Chemikalien	40
3.2 Präparation von Ejakulatspermien und Qualitätsbeurteilung	42
3.2.1 Analyse der Morphologie	44
3.2.2 Motilitätsanalyse.....	44
3.3 Screening auf Kälteresistenz in Eberspermien	45
3.3.1 Analyse des Membranstatus der Spermien.....	45
3.3.2 Mikrobiologische Untersuchung der Ejakulate	46
3.4 Präparation von Nebenhodenspermien.....	47
3.5 Gewinnung und Aufarbeitung von Seminalplasma.....	47
3.6 Inkubation von Nebenhodenspermien mit Seminalplasma	48
3.7 Präparation detergentresistenter Membrandomänen mit verschiedenen Detergenzien.....	49
3.8 Präparation von detergentresistenten Membrandomänen mit Triton X-100 aus Ejakulat- und Nebenhodenspermien.....	52
3.9 Lipidextraktion	53
3.10 Biochemische Lipidbestimmungen	53
3.10.1 Phosphatbestimmung zur Bestimmung des Phospholipidgehalts	53
3.10.2 Cholesterolbestimmung (r-Biopharm Kit).....	54
3.10.3 Cholesterolbestimmung (Amplex Kit)	54
3.11 Hochauflösende ³¹ P-NMR-Spektroskopie.....	55
3.12 Dünnschichtchromatographie.....	57
3.13 MALDI-TOF MS	57
3.14 Proteinbestimmung nach Smith [108]	58
3.15 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	58

3.16	Proteinidentifizierung mittels Trypsinverdau und anschließender MALDI-TOF MS Analyse	60
3.17	Statistische Analyse der Daten	61
4.	Ergebnisse	62
4.1	Präparation detergenzresistenter Membrandomänen mit unterschiedlichen Detergenzien.....	62
4.2	Analyse präparierter detergenzresistenter Membrandomänen (DRMs) aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien von Ebern.....	68
4.2.1	Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation	68
4.2.2	Lipid- und Proteinmengen in gewaschenen Spermien und DRMs aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien	69
4.2.3	Analyse der Lipidklassen in DRMs aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien mittels ³¹ P-NMR	72
4.2.4	Analyse der Lipidspezies der Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien mittels MALDI-TOF-MS	75
4.2.5	Protein-Analyse von DRMs aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien mittels SDS-PAGE	77
4.3	Analyse detergenzresistenter Membrandomänen (DRMs) aus Seminalplasma.....	79
4.3.1	Elektronenmikroskopische Untersuchung des Pellets nach der Ultrazentrifugation.....	79
4.3.2	Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation	79
4.3.3	Lipid- und Proteinanalytik der Seminalplasmaproben	80
4.3.4	Lipidanalyse der Seminalplasmaproben mittels ³¹ P-NMR	81
4.3.5	Lipidanalyse der Seminalplasmaproben (Pellets) mittels MALDI-TOF MS	82
4.3.6	Proteinanalyse der Seminalplasmaproben (Gradientenproben) mittels SDS-PAGE	83
4.4	DRM-Präparation aus Nebenhodenspermien nach Kontakt mit Seminalplasma.....	83
4.4.1	Motilität und Vitalität der Nebenhodenspermien mit und ohne Kontakt mit Seminalplasma und nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen.....	83
4.4.2	Dichtegradienten der Nebenhodenspermien mit Seminalplasmakontakt nach der Ultrazentrifugation.....	85
4.4.3	Lipid- und Proteinmengen der Nebenhodenspermien mit Seminalplasmakontakt.....	86
4.4.4	³¹ P-NMR Analyse der Nebenhodenspermien mit Seminalplasmakontakt	86
4.4.5	Proteinanalyse der Nebenhodenspermien mit Seminalplasmakontakt mittels SDS-PAGE	88
4.5	Kälteverträglichkeit von Eberspermien.....	89
4.5.1	Reaktion von Eberspermien verschiedener Individuen auf die Lagerung bei tiefen Temperaturen.....	89

4.5.2	Reaktion verschiedener Ejakulate ausgewählter Eber auf die Lagerung bei tiefen Temperaturen.....	91
4.5.3	Präparation und Analyse detergentenzresistenter Membrandomänen aus Eberspermien mit unterschiedlicher Kälteresistenz	95
5.	Diskussion.....	107
5.1	Bedeutung der DRM-Analyse für die Untersuchung von Membrandomänen in Säugerspermien	107
5.2	Veränderungen der DRMs während der Reifung im Nebenhoden und durch den Kontakt mit Seminalplasma	111
5.3	Individuelle Unterschiede in der Zusammensetzung der DRMs aus Eberspermien und die Toleranz gegenüber der Lagerung bei tiefen Temperaturen.....	119
5.4	Ausblick.....	124
6.	Literaturverzeichnis	127
7.	Anhang.....	138
7.1	Weitere Daten.....	138
7.2	Abbildungsverzeichnis	141
7.3	Tabellenverzeichnis.....	146
7.4	Publikationen.....	152
7.5	Poster und Vorträge.....	152

1. Abkürzungsverzeichnis

9-AA	9-Aminoacridin
AFLP	<i>Amplified restriction fragment length polymorphism</i>
BTS	<i>Beltsville Thawing Solution</i>
CHO	Cholesterol
C/P	Verhältnis von Cholesterol zu Phospholipiden [mol/mol]
CTB	Choleratoxin B
D.	Durchschnitt
DE-Modus	<i>delayed extraction mode</i>
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DHAP-S	Dihydroxyacetonphosphat-Synthase
DiIC	Dialkylcarbocyanin
DPPA	1,2-Dipalmitoylphosphatidsäure
DPPG	1,2-Dipalmitoylphosphatidylglycerol
DRM	Detergenzresistente Membranregion (<i>detergent resistant membrane domain</i>)
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FLIM	Fluoreszenz Lebenszeitmessungen (<i>Fluorescence lifetime imaging microscopy</i>)

FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
G.-Tag	Gewinnungstag
GPC	Glycosylphosphatidylcholin
GPE	Glycosylphosphatidylethanolamin
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
GPMV	<i>Giant plasma membrane vesicle</i>
GUV	<i>Giant unilamellar vesicle</i>
HBS	Hepes-Puffer (<i>Hepes buffered solution</i>)
HLB	<i>Hydrophilic-lipophilic-balance</i>
KBE	Kolonie bildende Einheiten
L _d -Phase	Ungeordneter Phasenzustand (<i>Liquid-Disordered-Phase</i>)
L _o -Phase	Geordneter Phasenzustand (<i>Liquid-Ordered-Phase</i>)
LPC	Lysophosphatidylcholin
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser-desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MβCD	Methyl-
MW	Mittelwert
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
NBD	Nitro-2-1,3-Benzoxadiazol-4-yl
NH	Nebenhoden
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>

Nr.	Nummer
ODAF	5-(N-Octadecanoyl)aminofluorescein
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PALM	Photo-aktivierte Lokalisationsmikroskopie (<i>Photo-activated localisation microscopy</i>)
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipid
PLTP	Phospholipid-Transfer-Proteine
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoylphosphatidylcholin
POPE	1-Palmitoyl-2-Oleoylphosphatidylethanolamin
PS	Phosphatidylserin
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure (<i>polyunsaturated fatty acid</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGG	Sulfolactosylglycerolipid (Seminolipid)
SIM	Strukturierte Illuminationsmikroskopie (<i>structured illumination microscopy</i>)
SLIP	<i>Seminolipid immobilizing protein</i>
SM	Sphingomyelin
SOPC	1-Stearoyl-2-Oleoylphosphatidylcholin
SP	Seminalplasma

SPFI	<i>Single particle fluorescence inmaging</i>
Std	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
STED	<i>Stimulated emission depletion</i>
TEA	Triethylamin
TLC	Dünschichtchromatographie (<i>thin layer chromatography</i>)
ZP	Zona pellucida

2. Einleitung

In dieser Arbeit wurden detergentenresistente Membrandomänen aus Eberspermien untersucht: ihre Veränderungen während der Reifung im Nebenhoden bis hin zu den Ejakulatspermien sowie mögliche Unterschiede dieser Domänen bei Individuen, deren Spermien sich durch unterschiedliche Kältetoleranz auszeichneten. Im Folgenden wird ein Überblick über den Aufbau von Eberspermien, über den Aufbau von Membranen dieser spezialisierten Zellen mit Fokus auf Membrandomänen und über die Kältetoleranz von Spermien gegeben. Außerdem werden Ergebnisse aus Vorarbeiten beschrieben und dabei die Eignung eingesetzter Analysemethoden näher erläutert.

2.1 Das Spermium – eine spezialisierte Zelle im Auftrag der Reproduktion

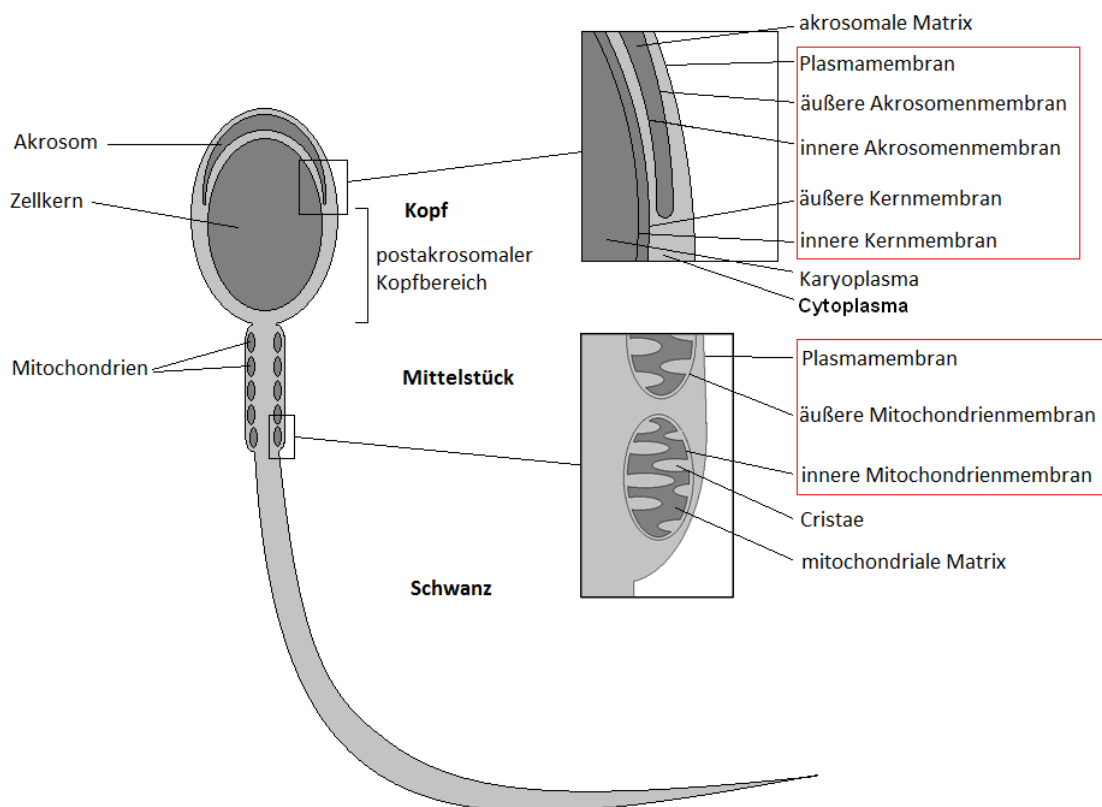


Abbildung 1: Schematische Abbildung eines Säugerspermiums mit seinen zugehörigen Membranen (rot umrandet)

Bei Spermien handelt es sich um sehr spezialisierte Zellen, die die Aufgabe haben, die genetische Information des männlichen Tieres zur Eizelle zu bringen. Wie die Eizelle besitzen

diese Keimzellen einen haploiden Chromosomensatz, der nach erfolgreicher Befruchtung mit dem haploiden Chromosomensatz der Eizelle zu einem diploiden Chromosomensatz zusammengesetzt wird. Das genetische Material (die DNA) liegt gut verpackt im Kopf der Spermienzelle. Zum Schutz ist das Chromatin weitgehend kondensiert und an sogenannte Protamine gebunden, die in den Spermien die Histone ersetzen. Die Zellen sind daher genetisch inaktiv. Alle während der Reifung benötigten RNAs bzw. Proteine müssen bereits in der ungereiften Keimzelle vorliegen oder von außen zugeführt werden. Um die Eizelle zu erreichen, besitzen Spermien einen Schwanz, mit dem sie sich im weiblichen Genitaltrakt fortbewegen können. Dieser gleicht vom Bau her der Geißel von Einzellern und besitzt im Innern die typische 9+2-Struktur aus Mikrotubuli, d. h. zwei innen nebeneinander liegende Mikrotubulifasern werden von neun weiteren Mikrotubulifaserpaaren ringförmig umhüllt. Zwischen Kopf und Schwanz befindet sich das sogenannte Mittelstück, in dem die Mitochondrien der Spermienzelle liegen, die die Energie für die Fortbewegung der Zelle bereitstellen.

Im Spermienkopf findet man das sogenannte Akrosom. Dieses auch als Kopfkappe bezeichnete Organell umhüllt den Zellkern wie ein Becher. Das Akrosom ist von einer Doppelmembran umschlossen. Man unterscheidet zwischen der inneren Akrosomenmembran, die dem Zellkern zugewandt ist, und der äußeren Akrosomenmembran, die der Plasmamembran zugewandten Membran. Das Innere des Akrosoms bildet die akrosomale Matrix, in der hydrolysierende Enzyme (Akrosin, Esterasen, Hyaluronidasen und saure Proteinasen) enthalten sind. Bei der Befruchtung werden diese Enzyme freigesetzt (Akrosomenreaktion) und sind für den Verdau der Zona pellucida zuständig, die die Eizelle umgibt. Dadurch wird die Plasmamembran der Eizelle für das Spermium zugänglich und kann mit der Eizelle verschmelzen.

Somit findet man bei Spermien folgende Membranen: die **Plasmamembran**, die die Zelle nach außen abgrenzt, die **innere und die äußere Akrosomenmembran**, die das Akrosom umschließen, die **Membranen des Zellkerns** und die **Membranen der Mitochondrien** im Mittelstück (**Abbildung 1**).

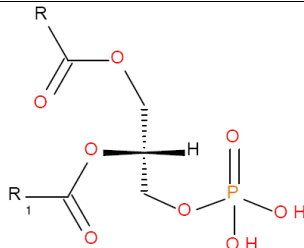
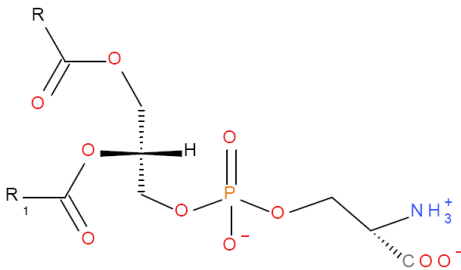
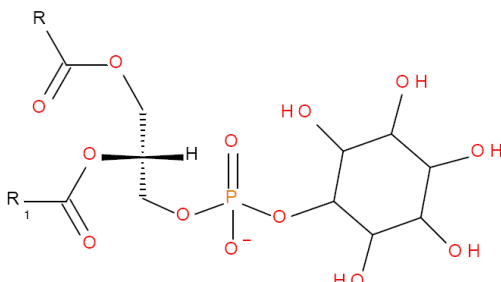
2.2 Asymmetrischer Aufbau von Zellmembranen

Spermien sind wie alle biologischen Zellen von einer Phospholipid-Doppelmembran (*lipid bilayer*) umgeben. Diese besteht aus verschiedenen Phospholipiden, Cholesterol sowie ein-

und angelagerten Proteinen. Spermien besitzen im Vergleich zu vielen anderen Zellen einen hohen Anteil an Lipiden mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie beispielsweise Docosahexaensäure (22:6). Diese sorgen für eine höhere Fluidität der Membran, die für die Befruchtungsfähigkeit erforderlich ist [75].

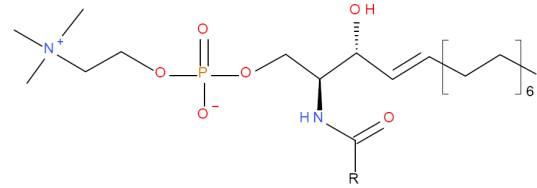
In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Lipide der Membranen von Spermien mit ihren Strukturformeln und Abkürzungen, die im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet werden, zusammengestellt:

Tabelle 1: Namen, Abkürzungen und Strukturformeln diverser Lipide. Vom Glycerophosphatidylethanolamin ist nur die Kopfgruppe dargestellt (i)), es kommt analog zum Glycerophosphatidylcholin in den drei dargestellten Formen (f) bis h)) vor. R, R₁: Fettsäurereste (Acylreste), R₂: Alkylrest, R₃: Alkenylrest

Lipid	Abkürzung	Strukturformel
a) Phosphatidsäure	PA	
b) Phosphatidylserin	PS	
c) Phosphatidylinositol	PI	

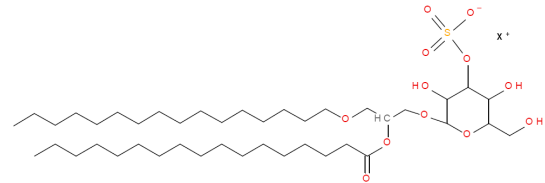
d) Sphingomyelin

SM



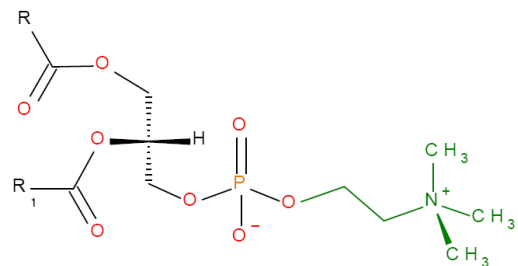
e) Seminolipid (1-o-Palmitoyl-2-o-palmitoyl-3-β-(3'-sulfogalactosyl)-glycerol)

SGG



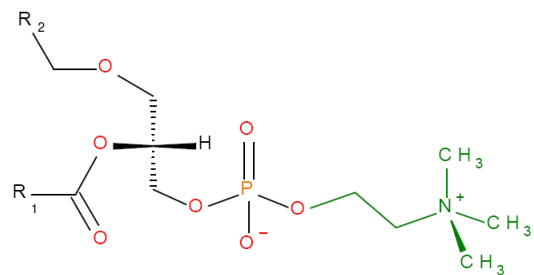
f) 1-Acyl-2-acyl-glycero-phosphatidylcholin
(Diacylglycero-phosphatidylcholin)

diacylGP
C



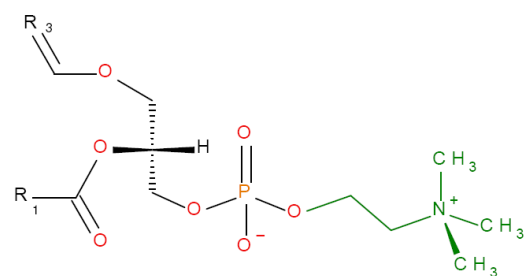
g) 1-Alkyl-2-acyl-glycerophosphatidylcholin
(Etherlipid)

etherGPC



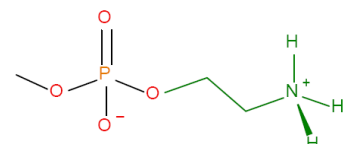
h) 1-Alkenyl-2-acyl-glycerophosphatidylcholin
(Plasmalogen)

plasmGP
C



i) Phosphatidylethanolamin
(Kopfgruppe)

PE



Wie in Tabelle 1 f), g) und h) dargestellt, können die Fettsäurereste (bzw. Alkyl- und Alkenylreste) des GPCs über drei verschiedene Arten von Bindungen gebunden sein.

Entsprechend kann auch das Glycerophosphatidylethanolamin (GPE) in diesen drei Formen auftreten, daher ist in Tabelle 1, i) nur die Kopfgruppe dargestellt. Sind beide Fettsäuren über eine Acylbindung (Tabelle 1, f)) gebunden, spricht man von DiacylGPC bzw. DiacylGPE. Bei Spermien lassen sich aber auch GPCs und GPEs finden, bei denen in der sn₁-Position ein Alkylrest über eine Etherbindung gebunden ist (Tabelle 1, g)). Diese werden im Folgenden als EtherGPC bzw. EtherGPE bezeichnet. Bei ihrer Bildung wird der Fettsäurerest durch einen langkettigen Alkohol ausgetauscht (Abbildung 2). Diese Synthese findet in den Peroxisomen des Nebenhodengewebes statt, sodass die dort gebildeten Etherlipide sezerniert und auf die Spermien übertragen werden [93]. Spermien selbst besitzen keine Peroxisomen. Humane Ejakulatspermien sind aber in der Lage, in DiacylGPE langkettige Alkohole (Hexadecanol) einzubauen, sodass etherGPE entsteht. Durch massive Methylierung kann dieses dann in etherGPC umgewandelt werden, zu dessen direkter Synthese Spermien nicht befähigt sind [49].

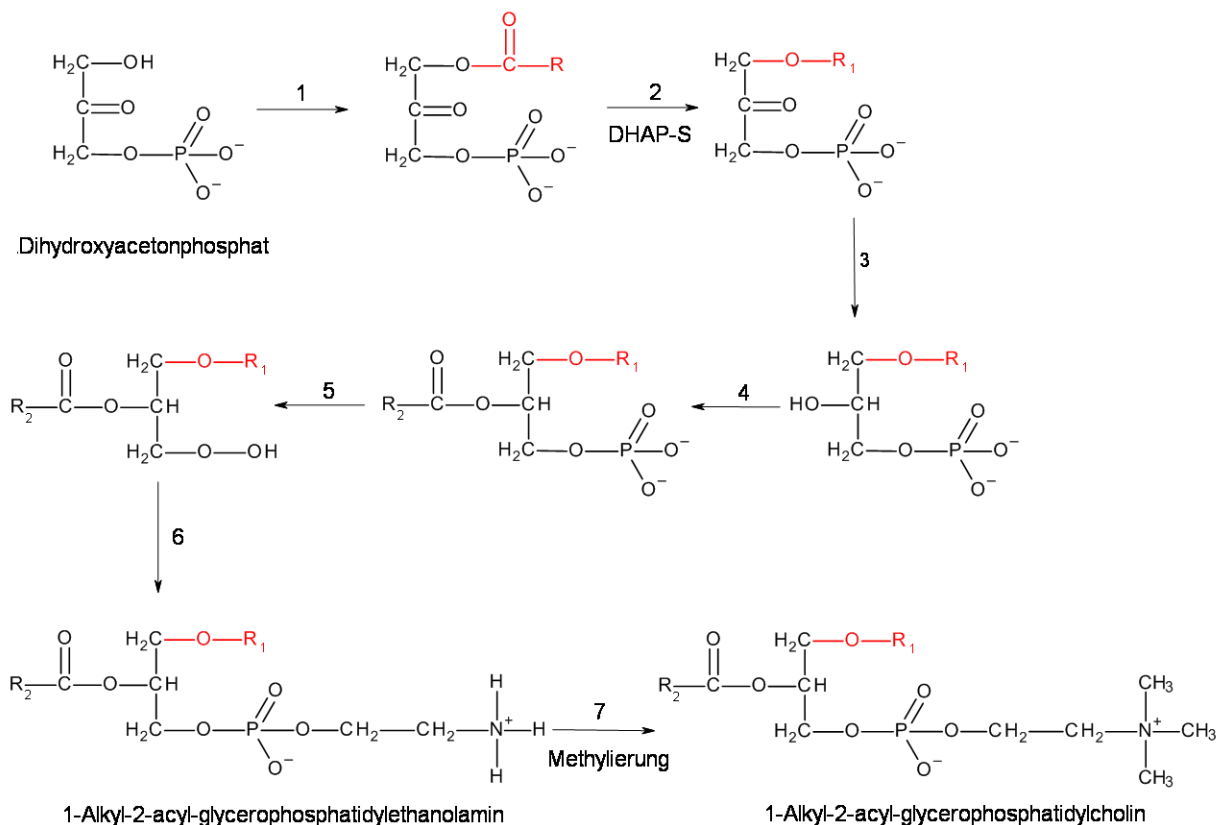
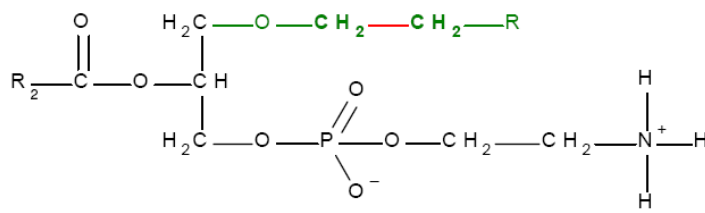
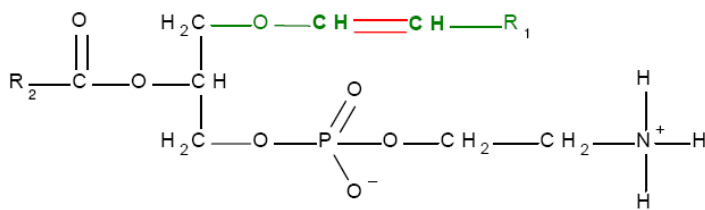
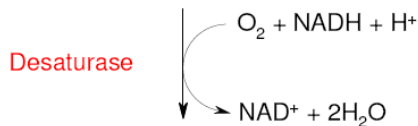


Abbildung 2: Einzelne Schritte der Etherphospholipidsynthese: 1) Acylierung durch Acyl-CoA, 2) Austausch des Carboxylatrestes durch einen Alkohol (durch Dihydroxyacetonphosphatsynthase = DHAP-S), 3) Reduktion durch NADPH, 4) Acylierung durch ein zweites Acyl-CoA, 5) Hydrolyse des Phosphatesters, 6) Transfer eines Phosphoethanolaminrestes und 7) Methylierung zu EtherGPC (nach [110], S. 274, sowie [49, 93]).



1-Alkyl-2-acyl-glycerophosphatidylethanolamin



1-Alkenyl-2-acyl-glycerophosphatidylethanolamin

Abbildung 3: Synthese eines Plasmalogens - durch Einbau einer Doppelbindung mittels einer Desaturase wird EtherGPE zu plasmGPE (nach [110], S. 275, sowie [127])

Aus den Etherlipiden entstehen durch Einbau einer Doppelbindung mittels einer Desaturase (Abbildung 3, [127]) die sogenannten Plasmalogene (Tabelle 1, h)). Diese kommen zu einem hohen Anteil in den Spermienmembranen vieler Säuger, insbesondere der Wiederkäuer, vor [27]. Die Plasmalogene besitzen am endständigen C-Atom des Glycerins ein Fettaldehyd, das über eine Enoletherbindung gebunden ist. Der am C₂-Atom gebundene Fettsäureester ist stets ungesättigt. Im Falle von Eberspermien, bei denen man ebenfalls einen relativ hohen Anteil an Plasmalogenen findet [58], handelt es sich bei dieser ungesättigten Fettsäure zumeist um Docosahexaensäure (22:6) oder Docosapentaensäure (22:5). Außerdem findet man in Spermien, wie in allen Zellmembranen, auf der äußeren Zellmembran Glycolipide, bei denen statt des Phosphats Mono- oder Oligosaccharide glycosidisch an das Lipid gebunden sind. Sie machen bei Säugerspermien in etwa einen Anteil von 10% aus [87]. So findet man bei Eberspermien beispielsweise das Seminolipid (1-O-Palmityl-2-O-palmitoyl-3-β-(3'-sulfogalactosyl)-glycerol), das zu den Sulfoglycolipiden gehört [58].

Als gebundene Fettsäuren kommen bei Eberspermien zumeist die gesättigten Fettsäuren Myristinsäure (14:0), Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0) und Arachinsäure (20:0) sowie

die ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2), Arachidonsäure (20:4) und die bereits erwähnte Docosapentaensäure (22:5) bzw. Docosahexaensäure (22:6) vor [87].

Die **transversale Verteilung** dieser Lipide in Zellmembranen ist **heterogen**: In der äußeren Lamelle auf der exoplasmatischen Seite befinden sich überwiegend GPC und SM, während in der inneren Lamelle auf der cytoplasmatischen Seite neben GPC überwiegend die Aminophospholipide GPE und PS zu finden sind [29, 54, 76]. Diese heterogene Verteilung wird mit Hilfe von Translokasen aufrechterhalten, die die Lipide auch entgegen einen bestehenden Konzentrationsgradienten von einer Membranhälfte in die andere transportieren. In der äußeren Akrosomenmembran, die der cytoplasmatischen Lamelle der Plasmamembran zugewandt ist, ist ebenfalls PS lokalisiert [55]. Das Auftreten von PS auf der Zellaußenseite wird somit als Zeichen für Apoptose betrachtet, wo die energieverbrauchenden Transportprozesse nicht mehr funktionieren.

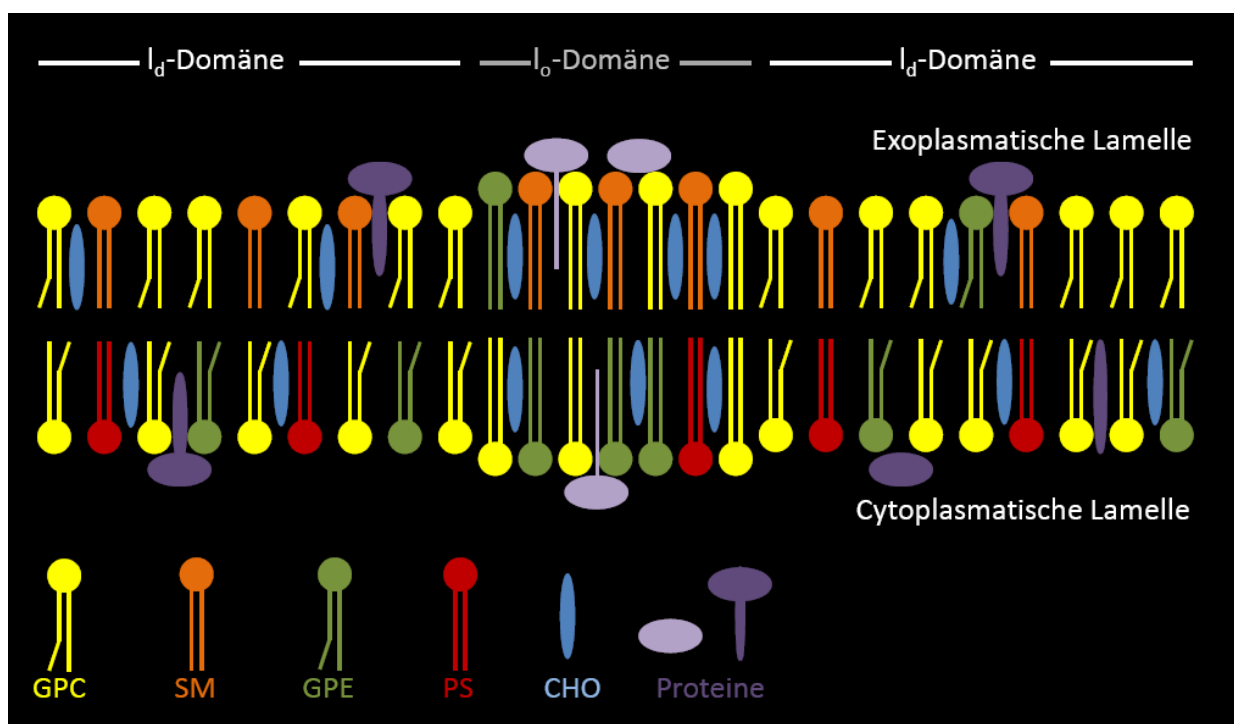


Abbildung 4: Schematisches Modell einer Zellmembran - Darstellung der lateralen (*Liquid-Ordered-Phase*, L_o und *Liquid-Disordered-Phase*, L_d) und transversalen Heterogenität, bei der die spezifischen Lipide und Proteine in bestimmten Membranbereichen angereichert sind. Die Proteine der L_o-Domäne sind heller dargestellt als die der L_d-Domäne.

Biologische Membranen besitzen auch eine **heterogene laterale Verteilung** ihrer Lipide und Proteine (**Abbildung 4**). In bestimmten Bereichen sind spezifische Lipide und Proteine inselartig angereichert. Diese werden als Mikrodomänen oder Rafts bezeichnet und besitzen

einen erhöhten Anteil an Glycosphingolipiden und Cholesterol und vor allem vorwiegend Lipide mit stärker gesättigten, langkettigen Fettsäuren [107]. Dies sorgt für eine verringerte Fluidität der Membrandomänen - die Lipidmatrix befindet sich in diesem Bereich im geordneten Phasenzustand (Liquid-Ordered-Phase, L_o), der auch als flüssigkristalliner Zustand bezeichnet wird, während sich die Umgebung in der ungeordneten Phase (Liquid-Disordered-Phase, L_d bzw. L_α) befindet. Cholesterol, das sich zwischen den Fettsäureresten der Phospholipide und Glycolipide der Membran aufhält, interkaliert ebenfalls bevorzugt im Bereich der L_o -Domänen [102]. Eine wichtige Rolle spielen zusätzlich die enthaltenen Proteine. Man nimmt aufgrund aktueller Ergebnisse an, dass Rafts durch Proteine des Zytoskeletts stabilisiert werden [57, 85].

In künstlich erzeugten Membranvesikeln, sogenannten *giant unilamellar vesicles* (GUVs), lässt sich mit definierten Lipidmischungen die Phasenseparation in L_o - und L_d -Domänen mittlerweile recht gut nachstellen und die Untersuchung der einzelnen Lipidphasen wird durch die mikroskopisch darstellbare Größe der Domänen erleichtert [18, 53, 79, 123].

In lebenden, unfixierten Zellen gestaltet sich der Nachweis von Rafts aufgrund der geringen Größe (10-200 nm, [90]) und der kurzen Lebensdauer (im Bereich von ms oder sogar ns) recht schwierig und ihre Existenz wird von einigen Forschergruppen durchaus noch angezweifelt [38, 61, 78, 104]. Trotzdem gibt es mittlerweile starke Hinweise für die Existenz von Rafts *in vivo*. So gelang es Eggeling und seinen Mitarbeitern [22] mittels der STED-Fernfeld-Fluoreszenznanoskopie (STED = Stimulated Emission Depletion), die unterhalb der Beugungsgrenze auflösen kann, Sphingolipide und Proteine mit einem Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in lebenden Zellen zu verfolgen. Diese hielten sich zeitweise (10-20 ms) nur in stark eingegrenzten Bereichen (mit weniger als 20 nm Durchmesser) auf. Neben der STED-Mikroskopie gibt es weitere Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie, die durch verschiedene Techniken und aufwendige Datenverarbeitung auch unterhalb der optischen Auflösungsgrenze von 200 nm Bilder erzeugen können. So beschreiben Owen *et al.* [85] in einem Review neben der STED-Mikroskopie auch die Funktionsweise weiterer Einzelmolekül-Techniken wie die strukturierte Illuminationsmikroskopie (= *structured illumination microscopy*, SIM) und die Photo-aktivierte Lokalisationsmikroskopie (= *photo-activated localisation microscopy*, PALM). Auch Methoden, die die Beweglichkeit von Proteinen und Lipiden untersuchen, wie beispielsweise *Fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP), die Fluoreszenzpolarisationsanisotropie und Fluoreszenzlebenszeitmessungen (FLIM) werden zur

Untersuchung von Rafts angewendet [107, 109]. Außerdem finden Techniken, die die Interaktionen zwischen Molekülen untersuchen, wie beispielsweise der Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), immer häufiger Anwendung bei der Untersuchung von Rafts [63, 101, 107]. Der Einsatz von *Quantum Dots* zur Markierung von Proteinen ermöglicht ebenfalls die Verfolgung von einzelnen Molekülen. So beobachteten Espinoza *et al.* [23] mittels *Quantum-Dots*-markierter Immunglobuline die eingeschränkte Beweglichkeit von Immunglobulinrezeptoren in Zellmembranen von Mastzellen, die sich in Domänen mit einer Größe von wenigen zehn bis über 100 nm aufhielten.

Da sich Cholesterol zu einem höheren Anteil in der L_o -Phase aufhält und einen wichtigen Beitrag zur Raftbildung liefert, wurde auch der künstliche Entzug von Cholesterol mittels Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) zur Untersuchung von Membrandomänen verwendet. Wheeler & Tyler [130] konnten mittels der Markierung lebender Zellen mit Laurdan (6-Dodecanyl-2-dimethylaminonaphthalen), das die Wellenlänge seiner emittierten Fluoreszenz in Abhängigkeit vom verfügbaren freien Wasser in der Membran ändert, nachweisen, dass sich nach Cholesterolentzug die Fluidität der Zellmembran vergrößerte. In lebenden Erythrozyten gelang der Nachweis, dass eine mittels Bodipy-GM₁ (N-(Bodipy®-FL-propionyl)-neuraminosyl-GM₁) beachtete Phasenseparation der Zellmembran durch Cholesterolentzug zerstört wurde [70]. Hao *et al.* [39] beschreiben wiederum, dass ein Cholesterolentzug mittels Methyl- β -Cyclodextrin zur Bildung sichtbarer Membrandomänen in TRVb-1-Zellen (Chinese Hamster Ovar Zelllinie) führte. Die Zellen wurden dafür zuvor mit dem fluoreszierenden Dialkylcarbocyanin (DiIC₁₆), das sich bevorzugt in der L_o -Phase aufhält, oder mit DiIC₁₂, das vorrangig in der L_d -Phase zu finden ist, markiert. Sie vermuten, dass sich durch den Cholesterolentzug kleinere, mit dem Fluoreszenzmikroskop nicht auflösbare Membrandomänen, zu größeren Domänen zusammenlagerten, die dann auch im Mikroskop sichtbar waren. Die Ergebnisse des Cholesterol-Entzugs müssen allerdings mit Vorsicht interpretiert werden: Der Ausfall einer Zellfunktion durch einen nicht natürlich vorkommenden Entzug von Cholesterol, muss nicht zwangsläufig mit der Lokalisation der beteiligten Proteine und Lipide in Membrandomänen zusammenhängen, denn der Cholesterolentzug könnte ebenso weitere Zellprozesse stören [21].

Es wird angenommen, dass die als Rafts bezeichneten Bereiche, im Gegensatz zu den umliegenden Membranbereichen, unter bestimmten Bedingungen gegenüber der Lyse durch Detergenzien stabil sind. Durch die eingeschränkte Inkorporation von Detergenzien werden sie als detergentresistente Membrandomänen (DRMs) bezeichnet. Sie lassen sich

anschließend aufgrund ihrer geringeren Dichte auf einem Dichtegradienten isolieren. Durch die höhere Packungsdichte innerhalb der Membranbereiche im geordneten Zustand sind die Lipide für die Detergenzmoleküle schlechter zugänglich und bleiben erhalten. Für einen präparativen Ansatz wurde daher versucht, sich diese Eigenschaft zu Nutze zu machen, und eine Isolierung mittels Triton X-100 und anderen Detergenzien durchgeführt [10]. Dieser Versuchsansatz wird allerdings inzwischen von vielen Wissenschaftlern sehr kritisch gesehen und es wird angezweifelt, ob die angereicherten DRMs dem nativen Zustand der Membrandomänen in den Zellen entsprechen [59, 107]. Ein kritisches Argument ist, dass bestimmte Lipide und Proteine künstlich angereichert werden. Durch den Eingriff mit dem nicht natürlicherweise in der Zellmembran vorkommenden Detergenz werden möglicherweise Artefakte erzeugt. Besonders die häufig niedrige Temperatur (4°C oder auf Eis) könnte die natürliche Struktur der Membran verändern, da das Gleichgewicht zwischen dem geordneten und ungeordneten Phasenzustand stark durch die Temperatur beeinflusst ist. So konnten Mikhalyov & Samsonov [70] an mit Bodipy-GM₁ markierten Erythrozyten feststellen, dass sich die Membrandomänen der Zellen bei einer Absenkung der Temperatur auf 4°C zu größeren, im Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Domänen zusammenlagerten. In einigen Gruppen wurden daher DRMs bei Körpertemperatur isoliert, die die erwarteten Eigenschaften von Rafts widerspiegeln [16, 20, 73]. Auch wurden bereits detergenzfreie Präparationen von Membrandomänen durchgeführt [52, 89]. Persaud-Sawin *et al.* [89] verglichen dabei die detergenzfreie Präparation mit der Triton X-100 basierten Methode und stellten fest, dass die detergenzfreie Methode vor allem für die Proteinverteilung die erwarteten Rafteigenschaften besser darstellte.

Eine Domänenbildung auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran scheint ebenfalls recht wahrscheinlich, indem beispielsweise bestimmte GPEs mit Cholesterol interagieren [37], obwohl der geringe Anteil an SM (etwa 15%) und ein hoher Anteil ungesättigter Fettsäuren in den Lipiden eher dagegen sprechen [21]. Möglicherweise werden die Membrandomänen der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran vor allem bei DRM-Präparationen nicht beobachtet, da das häufig verwendete Triton X-100 diese Strukturen zerstört [73, 92]. Morris *et al.* verwendeten daher für ihre DRM-Isolierung bei 37°C einen ionischen Puffer mit K⁺, Mg²⁺ und EGTA, um auch die innere Lamelle der Membrandomäne zu erhalten. Die dabei isolierten Strukturen ähnelten in ihren Eigenschaften recht stark den Eigenschaften, die für Rafts erwartet werden.

Es ist bekannt, dass sich bestimmte Proteine ebenfalls bevorzugt in Membrandomänen anreichern. Da die Membran in diesem Bereich durch die gesättigten Fettsäuren etwas dicker ist (4,8 nm gegenüber 3,9 nm, [68]), ist dies ein energetisch günstigerer Aufenthaltsort für Proteine, die eine längere Transmembrandomäne oder einen Lipidanker (beispielweise GPI-Anker) besitzen. Auch die Art des Lipidankers könnte den Aufenthaltsort eines Proteins bestimmen. So führten Zacharias *et al.* [133] FRET-Experimente mit fluoreszenzmarkierten Proteinen mit verschiedenen Lipidankern durch und konnten dabei zeigen, dass in Abhängigkeit vom Lipidanker eine Anreicherung in Rafts eher begünstigt wurde oder nicht. Proteine mit einem GPI-Anker spielen auch eine Rolle bei der Zusammenlagerung mehrerer kleiner Rafts zu größeren, stabileren Raftdomänen [66]. Durch diese selektive Anreicherung bestimmter Proteine sowie auch die Möglichkeit der reversiblen Bildung größerer Raftdomänen werden die Membrandomänen zu *Hot Spots* für verschiedene Aufgaben der Zellen, wie die Sortierung von Proteinen, die Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen, Zell-Zell-Kontakte sowie zu Kontaktstellen für das Zytoskelett. So dienen Membrandomänen beispielsweise auch der Anreicherung der Hüllproteine, der anschließenden Assemblierung und dem Knospen von Viren [101]. Durch eine aktive Veränderung beispielsweise der Cholesterolmenge in der Membran oder durch *Crosslinking* spezifischer Proteine könnte die Bildung von Rafts bzw. die Zusammenlagerung bestimmter Proteine in diesen Membrandomänen reguliert und so die Zellen auf unterschiedliche Funktionen vorbereitet werden. So konnten Sharma *et al.* durch *Crosslinking* von Proteinen mit einem GPI-Anker die Bildung von größeren, langlebigeren Domänen zeigen [103]. Auch Edidin [21] postulierte die Zusammenlagerung von kleinen, instabilen Raftdomänen zu größeren, stabileren funktionalen Einheiten. Auch für kleine Rafts wäre es denkbar, dass sie selbst über längere Zeiträume stabil bleiben und nur Einzelkomponenten rasch zwischen Raft und der sie umgebenden l_d -Phase wechseln [73]. Ebenso wäre eine l_o -Phase mit kleinen eingelagerten l_d -Domänen denkbar. Der hohe Cholesterolgehalt der Plasmamembran würde diese Vorstellung stützen [109].

Fest steht, dass **spezielle Lipide** in Verbindung mit **speziellen Proteinen Rafts** in **verschiedenen Größen und zeitlichen Dimensionen stabilisieren**. Sie ermöglichen so eine **Strukturierung der Membran** und damit **funktionale Variabilität**. Mittels **DRM-Präparationen** können solche **Lipide und Proteine isoliert** werden, die bestimmte **Eigenschaften widerspiegeln**. Eine **mögliche Artefaktbildung** muss dabei stets berücksichtigt werden. Die **exakte Funktion** der isolierten Lipide und Proteine *in vivo* kann dann genauer **untersucht** werden.

In der Plasmamembran von Spermien lassen sich größere Lipiddomänen in den verschiedenen funktionalen Abschnitten des Spermienkopfes finden, deren Diffusionseigenschaften sich unterscheiden. Auch die Diffusionseigenschaften der Lipide im Mittelstück und im Schwanz unterscheiden sich [56]. So fanden Wolfe *et al.* [132] unterschiedliche Diffusionskoeffizienten für die verschiedenen Abschnitte in Säugerspermien (aus Bulle, Eber, Schafbock, Maus und Meerschwein), indem sie diese mit 5-(N-Octadecanoyl)aminofluorescein (ODAF) markierten und FRAP-Experimente durchführten. Im Spermienkopf gibt es drei Abschnitte: den akrosomalen Bereich, den äquatorialen Bereich und den postakrosomalen Bereich, die sich in ihren Diffusionseigenschaften unterscheiden [11]. Zwischen dem äquatorialen und dem postakrosomalen Bereich befindet sich eine Diffusionsbarriere, die Moleküle nur selektiv passieren lässt. Mit der Verfolgung von einzelnen DiIC₁₆-Molekülen (fluoreszierendes Dialkylcarbocyanin) und DiIC₁₆-Molekülkomplexen durch Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie (*single particle fluorescence imaging* = SPFI) gelang der Nachweis dieser Diffusionsbarriere bei Eberspermien. Sie lässt Einzelmoleküle, aber keine Molekülkomplexe passieren [44, 47]. Dieser molekulare Filter wird vermutlich durch Transmembranproteine gebildet, die mit dem Zytoskelett verbunden sind [47]. In unserer Arbeitsgruppe wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit [98] die Fluoreszenzlebenszeit von fluoreszenzmarkierten Lipiden (NBD-SM, NBD-Cholesterol, NBD-PS, NBD = Nitro-2-1,3-Benzoxadiazol-4-yl) in den Membranen lebender Eberspermien untersucht. Dabei konnten für die verschiedenen Abschnitte der Spermien (akrosomaler Kopfbereich, postakrosomaler Kopfbereich, Mittelstück, Schwanz) ebenfalls Unterschiede in den Fluoreszenzlebenszeiten festgestellt werden.

Da die Kommunikation und Interaktion der Spermien mit den Epithelien des weiblichen Genitaltraktes und vor allem der Eizelle zeitlich und räumlich genau abgestimmt sein muss, haben die Mikrodomänen ihrer Zellmembranen sicherlich ebenfalls eine besondere Bedeutung. Bereits 1995 postulierten Wolf *et al.* [131] Lipiddomänen in der Plasmamembran von Spermien. Durch *differential scanning calorimetry* (DSC) fanden sie in Spermienmembranen zwei Phasenübergänge, die im Bereich der physiologischen Temperatur lagen. Bei Säugerspermien (Mensch, Maus, Eber, Bulle) wurden für die Untersuchung von Membrandomänen zumeist DRMs isoliert [8, 33, 81, 83, 102]. Nixon *et al.* [82] fanden in DRMs aus Mäusespermien Chaperone, die mit GM₁ kolokalisiert waren (fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen). Sie postulierten daher, dass Rafts in Spermien unter anderem als Plattformen dienen, um Proteine zu modifizieren. Bei Mäusespermien gelang mittels einer detergentenfreien Präparation von Membrandomänen die Isolierung von

drei verschiedenen Sub-Domänen, die sich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung unterscheiden [4]. Watanabe *et al.* [124] stellten transgene Mäuse her, die in ihren Spermien ein fluoreszierendes Protein mit GPI-Anker exprimierten. So konnten sie dessen Umverteilung *in vivo* während der Spermienreifung beobachten und postulierten Umordnungen der Raftstrukturen in Mäusespermien während der Reifungsprozesse.

Weitere Beispiele zur Untersuchung von Membrandomänen in Spermien befinden sich auch im folgenden Kapitel (2.3), in dem Untersuchungen an Membrandomänen von Spermien hinsichtlich unterschiedlicher Reifungsstadien dargestellt werden.

2.3 (Membran-)Veränderungen bei Spermien im Rahmen der Reifung – der Weg vom Hoden bis zur Eizelle

Die Spermatogenese findet im Hoden (**Abbildung 5**) des männlichen Tieres statt und beginnt im äußeren Bereich der Samenkanälchen. Dabei entstehen aus den diploiden Spermatogonien durch mitotische Teilung weitere Spermatogonien, die dann zu diploiden Spermatozyten I differenzieren können. Die Spermatozyten I durchlaufen eine meiotische Teilung. Nach der Meiose I werden die dabei entstehenden haploiden Zellen als Spermatozyten II bezeichnet. Durch die Meiose II entstehen dann die haploiden Spermatiden. Diese verändern während der sich anschließenden Spermiogenese ihre Morphologie enorm: aus den kugelförmigen Spermatiden entstehen die langgestreckten Spermien mit Kopf und Schwanz. Die Energie dafür liefern die Sertolizellen, an die die Spermatiden gebunden sind. Die fertigen Spermien können dann über die *Ductuli efferentis* den Hoden verlassen und werden in den Nebenhoden verlagert. Am Ende der Spermatogenese werden die Histone gegen Protamine ausgetauscht und die Genexpression gestoppt. Beim Hausschwein dauert die Spermatogenese insgesamt 34 Tage [114].

Im Nebenhoden findet die weitere Reifung der Spermien statt: Im Nebenhodenkopf (Caput) und dem Nebenhodenkörper (Corpus) werden aus dem Epithel Lipide und Proteine sezerniert, die die Spermien aufnehmen. Dabei erlangen sie ihre Bewegungsfähigkeit. Über einen Cytoplasmotropfen werden von den Spermien außerdem überschüssiges Cytoplasma und nicht mehr benötigte Proteine und Lipide abgegeben. Im Nebenhodenschwanz (Cauda) werden die Spermien bis zur Ejakulation gespeichert, bei der sie über den Samenleiter und die Harnröhre das männliche Tier verlassen.

Betrachtet man die Veränderungen während der Nebenhodenpassage im Detail, so findet die Aufnahme bestimmter Lipide und Proteine über Lipidvesikel statt, die häufig als Epididymosomen bezeichnet werden [25, 111]. Die zu übertragenden Proteine befinden sich teilweise in den Membranen der Epididymosomen oder in deren Lumen [34]. Die Epididymosomen unterscheiden sich in den verschiedenen Nebenhodenabschnitten in ihrer Zusammensetzung, so ist ihr C/P-Gehalt in der Cauda höher als im Caput [35].

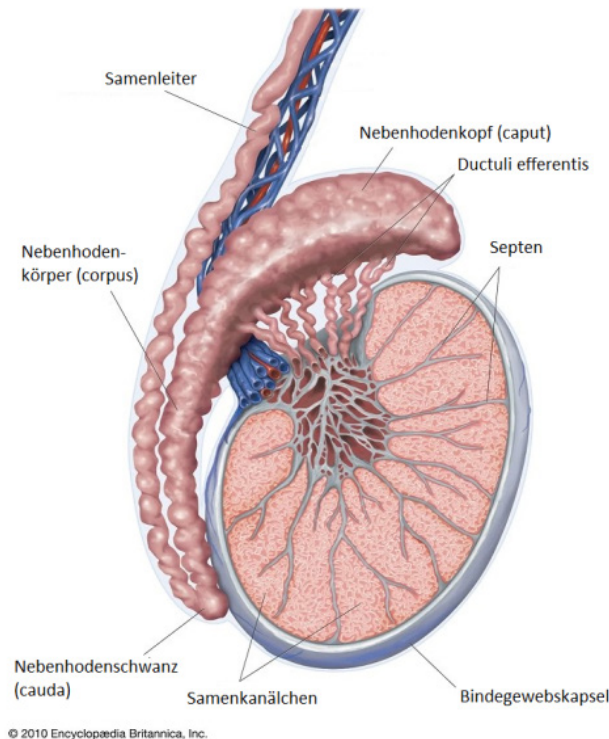


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Hodens mit dem Nebenhoden (modifiziert nach: http://www.prostatitisdr.com/prostatitis_epididymitis.html, 30.08.2012)

Bei den Spermienlipiden steigt vor allem der Gehalt an SM und langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (20:4, 22:5, 22:6) [51, 111]. So beschrieb Ladha [56] bei Säugerspermien während der Nebenhodenpassage eine Zunahme von hochungesättigten PLs und PLs mit Ether-Verbindungen, vor allem von GPC und GPE 16:0 alkyl/22:6 acyl. Der Diffusionskoeffizient in der Plasmamembran des Kopfes steigt während der Nebenhodenpassage [48]. Die negative Oberflächenladung der Plasmamembran nimmt ebenfalls zu, Oberflächenantigene werden umgeordnet und vermehrt Disulfidbrücken gebildet [111]. Außerdem werden GPI-verankerte Proteine aufgenommen, beispielweise HE1, HE5, Hyaluronidasen (SPAM1) und weitere Proteine, die später für die Bindung an die Zona pellucida der Eizelle verantwortlich sind [111]. HE1 kann Cholesterol binden und sorgt vermutlich für die Regulation des Cholesterolgehalts, was einen Einfluss auf die Menge und

Lokalisierung von Rafts haben könnte [51]. So stellten James *et al.* [45] durch Filipin-Markierung eine Umverteilung des Cholesterols bei Nebenhodenspermien gegenüber testikulären Spermien fest: Während sich bei den testikulären Spermien das Cholesterol gleichverteilt im akrosomalen Kopfbereich befindet, lässt sich bei Spermien der Cauda eine heterogene Cholesterolverteilung über die gesamten Spermien feststellen. Der Gesamtgehalt an Spermienlipiden sinkt bei vielen Säugern während der Nebenhodenpassage. So wurde dies für Spermien aus Bullen, Ebern, Schafböcken und Ratten beschrieben [80]. Als Ursache dafür wird eine Verstoffwechselung der Lipide vermutet, um sie als Energiequelle zu nutzen.

Bei der Untersuchung isolierter Plasmamembranen von Eberspermien aus den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens stellten Nikolopoulou *et al.* [80] fest, dass der Gehalt einzelner Proteine und Lipidklassen Veränderungen unterworfen ist. So nimmt der Gehalt an GPE, PS und PI ab, während der Anteil an GPC und SM steigt. Auch der Cholesterolgehalt sinkt, der Gehalt an Desmosterol und Cholesterolsulfat wiederum nimmt zu. Die damit verbundene Veränderung der Membranfluidität könnte erklären, dass Spermien während der Nebenhodenpassage empfindlicher gegenüber Kälteschockbehandlungen werden. Auch Ladha [56] beschreibt steigende Konzentrationen an Sterolsulfaten im Nebenhoden. Werden diese in die Spermienmembran aufgenommen, sorgen sie für eine Stabilisierung der Spermienmembran. Die Zersetzung der Sterolsulfate durch vorhandene Sulfatasen im weiblichen Genitaltrakt sorgt dann für eine Destabilisierung der Spermienmembran.

Buttke *et al.* [13] untersuchten mittels Markierung von GM₁ mit Cholera-toxin B (CTB) die Verteilung des Gangliosids in den Spermien, um daraus Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Membrandomänen ziehen zu können. Dabei stellten sie fest, dass sich nur bei Nebenhodenspermien GM₁ im akrosomalen Kopfbereich finden lässt (Mäuse-, Bullen- und Humanspermien). Bei Ejakulatspermien war keine Markierung möglich, was auf Umordnungen während der Reifungsprozesse deutet.

Während der Ejakulation kommen die Spermien mit dem Seminalplasma in Kontakt, das von der Prostata und anderen Geschlechtsdrüsen (beim Schwein zum größten Teil von der Samenblasendrüse und der Bulbourethraldrüse) gebildet wird. Das Seminalplasma enthält unter anderem freies Cholesterol, Vitamin E und Phospholipid-Transfer-Proteine (PLTP). Beim Eber sind die wichtigsten SP-Proteine die Spermadhesine, die peripher an der Spermienoberfläche assoziieren, und die Zonadhesine, bei denen es sich um integrale Membranproteine handelt. Die Membranproteine des SP befinden sich in sogenannten

Prostasomen, vesikelartigen Strukturen, die von der Prostata gebildet werden [3, 65]. Zahlreiche Proteine des Seminalplasmas wirken dekapazitierend, unter anderem die Spermadhesine des Schweins oder das Protein SVS2 der Maus [50]. Andere Proteine und Lipide des Seminalplasmas lösen in Kombination mit einem erhöhten Bicarbonatgehalt sowie Proteinen und Lipiden, die vom Epithel des weiblichen Genitaltrakts gebildet werden, den **Kapazitationsprozess** aus: Die Spermien werden hypermotil und erlangen Befruchtungsfähigkeit. Während sich das freie Cholesterol und die PLTPs des Seminalplasmas vorerst noch stabilisierend auf den Cholesterolgehalt der Spermien auswirken, sinkt der Gehalt an Cholesterol nach und nach im weiblichen Genitaltrakt, indem extrazelluläre Lipoproteine der Spermienmembran Cholesterol entziehen. *In vivo* übernehmen diese Aufgabe vermutlich High-Density-Lipoproteine und Albumin, die vom Uterus und den Eileitern sezerniert werden [102, 105], sowie das Protein NPC2 aus dem Seminalplasma [33]. Während die *lipid disorder* bereits zu Beginn des Kapazitationsprozesses rasch steigt [8], destabilisiert der sinkende Cholesterolspiegel die Spermienmembran in Vorbereitung auf die Akrosomenreaktion weiter [56]. Vermutlich wird bevorzugt das Cholesterol der L_d-Domänen entzogen und sorgt für Umverteilungen der Raftstrukturen [7, 102, 121]. Diese wandern in Richtung des akrosomalen Kopfbereiches und lagern sich zu größeren Raftstrukturen zusammen, um Signalwege für die Akrosomenreaktion zu aktivieren [47, 102, 136]. Dies ist schematisch in **Abbildung 6** dargestellt. So konnten Jones *et al.* [46] bei Mäusespermien auch eine Anreicherung von GM₁ und Zona-pellucida-Bindeproteinen im akrosomalen Kopfbereich nach Cholesterolentzug beobachten. Sowohl GM₁ als auch die untersuchten Zona-pellucida-Bindeproteine ließen sich in DRMs anreichern. DRMs aus Spermien konnten an homologe Eizellen [9, 82] bzw. Zona-pellucida-Proteine [81] binden. Weitere Forschungsgruppen [30-31, 121] beschreiben ebenfalls eine Anreicherung von Raft-Markerproteinen (Caveolin und Flotilin) in der Spitze des Spermienkopfes. Auch das GPI-verankerte Protein PH20 (mit Hyaluronidase-Aktivität) wandert aus dem Spermischwanz in den akrosomalen Kopfbereich [11]. Nixon und Aitken [81] beschreiben ebenfalls die Umverteilung von Membrandomänen in die apikale Kopfregion während der Kapazitation. Botto *et al.* [8] vermuten Raftvorläufer in der äußeren Akrosomenmembran, die während der Kapazitation durch Vesikeltransport in die Plasmamembran gelangen. Dafür sprechen würde, dass das Akrosom aus dem Golgi-Apparat der Spermiovorläuferzellen gebildet wird und der Trans-Golgi-Apparat als Ort der Raftassemblierung gilt.

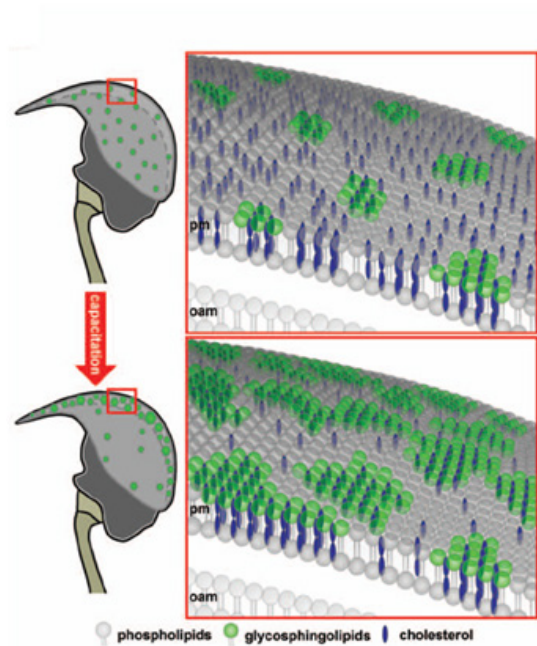


Abbildung 6: In der schematischen Darstellung wird die Anreicherung von Raftdomänen im akrosomalen Kopfbereich von Mäusespermien während der Kapazitation gezeigt (linke Bildhälfte). In der rechten Abbildungshälfte ist die Zusammenlagerung von kleineren Raftdomänen zu größeren Raftbereichen und der Entzug von Cholesterol aus I_d -Domänen der Plasmamembran während des Kapazitationsprozesses schematisch dargestellt (Abbildung aus Zitranski *et al.* [136]).

Auch die Tyrosin-Phosphorylierung bestimmter Proteine wird durch die Verringerung des Cholesterolgehalts der Membran ausgelöst [47, 102] und bereitet die Spermien auf die kommenden Prozesse vor. Sie ist mitverantwortlich für aktivierende Konformationsänderungen der Zona-pellucida-Rezeptoren [24]. Während man beim Cholesterol eine Konzentrationsverschiebung in Richtung des akrosomalen Bereichs des Spermienkopfes beobachten kann, findet eine entgegengesetzte Bewegung von Seminolipid im Spermienkopf statt. Es befindet sich vor der Kapazitation in der Spitze des Spermienkopfes und wird während der Kapazitation im äquatorialen Kopfbereich angereichert. Seminolipid besitzt eine schützende Funktion vor Fusionsprozessen, indem es der Bildung von dafür nötigen hexagonalen Lipidstrukturen (H_{II}) entgegenwirkt [30]. Es gilt zu beachten, dass die oben beschriebenen Veränderungen an kapazitierenden Spermien mangels Verfügbarkeit von *in vivo* kapazitierten Spermien stets an Spermien durchgeführt wurden, die *in vitro* kapazitiert wurden. Gleiches gilt für die Untersuchungen der Akrosomenreaktion, die im Folgenden beschrieben wird.

Die **Akrosomenreaktion** wird durch den Kontakt der Zona-pellucida-Rezeptoren der Spermien mit der Zona pellucida (unter anderem dem Protein ZP3 = ZPC, [81]) der Eizelle

und Progesteron bei kapazitierten Spermien ausgelöst. Das Progesteron wird von den Kumuluszellen der Eizelle sezerniert. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel steigt deutlich an, wobei Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum und Speichern im Akrosom ins Cytoplasma einströmt [136]. Die Plasmamembran der Spermien depolarisiert. Progesteron fördert die Bildung von L_d -Domänen, die laterale Diffusion der Lipide erhöht sich [105]. Der dem Akrosom aufliegende Teil der Plasmamembran verschmilzt mit der äußeren Akrosomenmembran, sodass die akrosomale Matrix mit ihren hydrolysierenden Enzymen freigegeben wird. Diese Enzyme lysieren die Zona pellucida der Eizelle und geben so für das Spermium den Weg zur Plasmamembran der Eizelle frei. Die innere Akrosomenmembran fungiert anschließend als Plasmamembran und schließt die Zelle im akrosomalen Bereich ab. Im äquatorialen Bereich verbindet sie sich über eine Haarnadelstruktur mit der äquatorialen Plasmamembran [30]. Der Kontakt des Spermiums mit der Eizelle erfolgt zunächst mit der Spitze des Spermienkopfes unter anderem über das Protein Cyritestin der inneren Akrosomenmembran mit Integrinen der Eizelle. Für die Verschmelzung der beiden Zellen lagert sich das Spermium dann mit dem äquatorialen Bereich des Kopfes an die Membran der Eizelle. Dabei spielen unter anderem das Protein Fertilin β des Spermiums und wiederum Integrine der Eizelle eine Rolle und vermitteln den Kontakt. Außerdem wird vermutet, dass das Protein SLIP (*Seminolipid immobilizing protein*) des Oolemmas mit Seminolipiden der äquatorialen Spermienmembran Kontakt aufnimmt, diese immobilisiert und durch Desulfataseaktivität in Desulfoseminolipid umwandelt. Desulfoseminolipid begünstigt durch seine kleine Kopfgruppe die Fusion von Membranen [24].

Bereits Flesch und Gadella vermuteten eine Virus-artige Verschmelzung von Spermium und Eizelle [24]. SNARE-Proteine lassen sich in den Membranen von Epididymosomen, der äußeren Akrosomenmembran und der Plasmamembran der Spermien finden. Sie lassen einen Vesikeltransport zwischen den Epididymosomen und den reifenden Spermien vermuten [35] und bilden Funktionseinheiten für die Fusion der Plasmamembran mit der äußeren Akrosomenmembran während der Akrosomenreaktion und der Plasmamembranen vom Spermium und der Eizelle während der Befruchtung [31, 67, 119, 136]. So stellten Tsai *et al.* [119] bei Eberspermien fest, dass sich die t-SNAREs Syntaxin 1 und 2 in der Plasmamembran und das v-SNARE VAMP in der äußeren Akrosomenmembran befanden, um dann während der Akrosomenreaktion die Exocytose zu vermitteln. Durch DRM-Präparationen und Fluoreszenzmikroskopie konnten sie außerdem eine Umverteilung dieser Proteine in Richtung der Spitze des Kopfbereiches während der *in-vitro*-Kapazitation nachweisen. So wurden die Proteine vor der Kapazitation überwiegend in der Detergenz-löslichen Fraktion gefunden und

reicherten sich erst nach der Kapazitation bevorzugt in DRMs an. Vermutlich verhindern Gerüstproteine wie beispielweise MUPP1 eine vorzeitige Fusion der Membranen [136].

Eine essentielle Rolle während der Fusion von Spermium und Eizelle übernehmen die Proteine CD9 der Eizelle und IZUMO1 des Spermiums [71, 94]. Bei transgenen Mäusen mit fluoreszenzmarkierten IZUMO1-Proteinen führten Satouh *et al.* [94] fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Fusionsprozess der beiden Keimzellen durch. Dabei stellten sie fest, dass IZUMO1 beim Kapazitationsprozess von der inneren und äußeren Akrosomenmembran in den äquatorialen Bereich der Plasmamembran wandert. Beginnt das Spermium im äquatorialen Bereich mit der Eizelle zu fusionieren, geht IZUMO1 auf die Plasmamembran der Eizelle über. Die innere Akrosomenmembran schließt sich bei der Fusion der Zellen zu einem Vesikel ab, der endozytotisch von der Eizelle aufgenommen wird. Ein kleiner Teil der IZUMO1-Moleküle verbleibt die ganze Zeit in der inneren Akrosomenmembran und ist auch noch im Vesikel in der Eizelle sichtbar.

Die Vereinigung des genetischen Materials beider Keimzellen ist hingegen kein Fusionsprozess: Die Kernhüllen der beiden haploiden Vorkerne lösen sich auf und die Chromosomen werden vom Spindelapparat der befruchteten Eizelle angeordnet. Erst nach der Furchung werden in den Tochterzellen diploide Kerne mit neuen Kernmembranen gebildet ([14], S. 1035).

2.4 (Membran-)veränderungen bei Spermien durch Einflussfaktoren bei künstlichen Reproduktionstechniken

Sowohl bei der landwirtschaftlichen Reproduktion der Nutztiere als auch im Rahmen von Arterhaltungsprojekten kommen immer stärker künstliche Reproduktionstechniken zum Einsatz. Sie erhöhen die Produktivität in der Nahrungsmittelindustrie oder ergänzen die natürliche Reproduktion von Wild- und Zootieren in Zuchtprogrammen. Im Rahmen dieser Techniken ist häufig eine mehr oder minder lange Lagerung der Spermien oder ein Transport dieser Keimzellen notwendig, damit sie zeitgleich mit den Eizellen für eine *in-vitro*-Befruchtung oder für eine künstliche Besamung der Muttertiere zur Verfügung stehen. Dabei werden die Spermien mit Verdünnermedien versetzt, die mit ihren Inhaltsstoffen die Lebensfähigkeit dieser Keimzellen außerhalb des männlichen oder weiblichen Genitaltraktes verlängern und auch dafür sorgen, dass die Lagerung der Zellen bei niedrigen Temperaturen oder sogar in gefrorenem Zustand möglich wird. Während des Einfrierens und Auftauens sind die Spermien verschiedenen Stressoren ausgesetzt: Neben der Gefahr durch Bildung von zerstörerischen Eiskristallen in den Spermien sind sie durch das Gefrieren und Tauen des Umgebungswassers vor allem osmotischem Stress ausgesetzt. Die volumetrischen Änderungen der Zellen sorgen dabei für Dehnungen und Stauchungen der Membran [86]. Durch den Entzug des membrangebundenen Wassers und die durch die niedrigen Temperaturen verringerte Membranfluidität werden die Spermienmembranen zusätzlich destabilisiert. So fanden James *et al.* [45] bei Humanspermien selbst nach dem Auftauen noch eine verringerte Lipiddiffusion. Da auch die Phasenbildung der Membranlipide durch die Temperatur beeinflusst wird, können die natürlichen l_o - und l_d -Domänen ebenfalls nicht aufrechterhalten werden. Die dadurch entstehende Reorganisation der Membran beeinflusst ihre Integrität, Struktur und letztendlich Funktion [125]. Müller *et al.* [75] fanden allerdings bei Schafbockspermien, dass die transversale Lipidassymetrie von PS und GPC nach Einfrieren und anschließendem Auftauen der Spermien erhalten bleibt, obwohl die Aktivität der Aminophospholipid-Translokase nach der Kryobehandlung verlangsamt ist. Auch bei Koalaspermien bleibt das PS nach dem Einfrieren und Auftauen in der inneren Lamelle. Ebenso konnten im Fluoreszenzmikroskop keine Veränderungen in der Verteilung von GM_1 beobachtet werden [134]. An Humanspermien konnte gezeigt werden, dass nach dem Einfrieren Lysolipide (aus GPC) und Ceramid (aus SM) entstanden. Als Ursache dafür wird eine Aktivierung der Phospholipase A_2 und der Sphingomyelinase durch membranzerstörende Prozesse und den Abbau toter Spermien vermutet [95]. Außerdem sorgt der Kälteschock für

den Verlust von Phospholipiden [86], so fanden beispielsweise Buhr *et al.* [12] bei kryokonservierten Eberspermien einen Verlust an SM. Auch ein Verlust an Cholesterol wird beschrieben, der zu „kapazitationsartigen Membranveränderungen“ der Spermien führt [72].

Als schützende Stoffe werden den Gefriermedien beispielsweise Glycerol, Polyvinylpyrrolidin, Dimethylsulfoxid oder Eidotter zugesetzt [5, 45, 86, 113]). Beim Eidotter wird vermutet, dass seine schützenden Eigenschaften durch das darin enthaltene Cholesterol und seine Low Density Lipoproteine entstehen, die, durch die Bereitstellung von Lipiden, den durch die Kälte verursachten Verlust an Cholesterol und Phospholipiden verhindern können [86]. So zeigten Swain und Miller [113] an Elefantenspermien, dass der dem Gefriermedium zugesetzte Eidotter den Anteil an Lipiden mit längeren und stärker ungesättigten Fettsäuren in den Spermien erhöhte.

Generell scheint es für das Einfriervermögen der Spermien von Vorteil zu sein, einen höheren Anteil an langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren und einen hohen Anteil von Cholesterol im Verhältnis zu den Phospholipiden zu haben [113]. So lassen sich spezies-spezifische Unterschiede in der Gefriertauglichkeit von Spermien verschiedener Arten finden: Während sich Bullen- und Schafbockspermien durch ihren hohen Anteil an langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren gut einfrieren lassen [113], scheinen Humanspermien (mit eher kürzeren gesättigten Fettsäuren) diese Eigenschaft vor allem ihrem hohen Cholesterolgehalt zu verdanken ($C/P = 1,0$, [86]). Die Spermien von Katzenartigen besitzen eher schlechte Einfriereigenschaften [115] und zeichnen sich durch einen höheren Anteil an Diacylphospholipiden und einen sehr geringen Anteil an Plasmalogenen aus [27]. Ihr C/P-Wert liegt bei 0,3 [77].

Eberspermien sind bereits kälteempfindlich [69, 86, 125]. Sie besitzen ein niedriges Cholesterol zu Phospholipid Verhältnis ($C/P = 0,2$, [86]). Der Anteil an langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Docosahexaensäure) ist gegenüber Bullenspermien zwar geringer (ähnlich dem Menschen, [113]), aber der Anteil an Etherlipiden und Plasmalogenen, die zumeist in sn_2 -Position eine langkettige, ungesättigte Fettsäure gebunden haben, ist deutlich höher als bei Katzenartigen [27]. Möglicherweise ist daher auch die spezifische Zusammensetzung oder Verteilung ihrer Phospholipide relevant. Die Qualität von Eberspermien verschlechtert sich rasch während der Lagerung bei tiefen Temperaturen, selbst bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes. Kryokonservierte Eberspermien besitzen nach dem Auftauen verringerte Fertilitätsraten. So beschreiben Medrano *et al.* bei aufgetauten

Eberspermien Fertilitätsraten von unter 50%, während die Fertilitätsraten von flüssigkonservierten Eberspermien bei 80% liegen [69]. Während der Flüssigkonservierung werden die Eberspermien bei 16-18°C gelagert und innerhalb weniger Tage für die Besamung eingesetzt. Da bei diesen Temperaturen ein vermehrtes Keimwachstum zu erwarten ist, wird dem Verdünnermedium üblicherweise ein Antibiotikum zugesetzt. Leider erwerben immer mehr Bakterienstämme eine Resistenz gegen diverse Antibiotika [1, 129]. Eine Verringerung oder gar Vermeidung der zugesetzten Antibiotika wäre daher wünschenswert. Neben der Zugabe anderer keimhemmender Substanzen, wie beispielsweise antimikrobieller Peptide [100], wäre die Lagerung bei tieferen Temperaturen eine weitere Strategie, dies zu erreichen.

Neben den speziesspezifischen Unterschieden in der Gefriertauglichkeit von Spermien werden auch individuelle Unterschiede der Kryotoleranz beschrieben. So gibt es individuelle Eber, deren Spermien den Gefrier- und Tauprozess besser überstehen als die Spermien anderer Individuen [15, 125]. Die kältetoleranten Spermien weisen nach der Kryokonservierung einen höheren Anteil langkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf [125]. Möglicherweise können kryotolerante Spermien Lipide aus dem zugesetzten Eidotter des Verdünners besser aufnehmen [15]. Morrell *et al.* [72] vermuten einen Effekt des Seminalplasmas. Auch wird eine Verbesserung der Kryotoleranz von kältesensitiven Spermien durch den Zusatz des Seminalplasmas von Ejakulaten mit gutem Einfriervermögen beschrieben [40].

2.5 Charakteristika von DRMs in Säugerspermien

Bei den bisherigen Untersuchungen an DRMs in Säugerspermien wurde zumeist ein opaleszentes Band im Saccharosedichtegradienten an der Grenze von 5% zu 35% Saccharose beschrieben. Durch die Lichtstreuung an den isolierten Membrandomänen konnte für das opaleszente Band eine erhöhte Absorption bei 620 nm gemessen werden [81, 102]. Botto *et al.* [8] stellten an Ejakulatspermien des Ebers eine Anreicherung von Cholesterol und GM₁ in den isolierten DRMs fest. Auch van Gestel *et al.* [121] stellten erhöhte Cholesterolwerte in den DRMs aus ejakulierten Eberspermien fest, der Sterol/GPC-Wert stieg von 0,50 in Spermien auf 0,79 in den DRMs und veränderte sich auch nicht durch *in-vitro*-Kapazitation der Spermien. In Bullenspermien wiederum wurde ein geringerer Cholesterolgehalt in den DRMs aus Ejakulatspermien und Nebenhodenspermien aus der Cauda gegenüber der Triton-löslichen Fraktion gefunden. Nur in den Nebenhodenspermien aus dem Caput war das Verhältnis umgekehrt [33]. Entsprechende Vergleichsuntersuchungen von DRMs aus Nebenhoden- und Ejakulatspermien beim Eber sind nicht bekannt. In einer detergentfreien Präparation von DRMs aus Mäusespermien wurden in den drei erhaltenen DRM-Fractionen individuelle Unterschiede in der Sterol-, GM₁-, Phospholipid- und Proteinzusammensetzung festgestellt [4]. Außerdem wurde Sulfogalactosylglycerolipid (SGG = Seminolipid) in den DRMs aus Eberspermien isoliert [9, 128]. Ein Großteil der bisherigen Arbeiten fokussierte sich auf die Analyse der Proteine in den isolierten DRMs [17, 82, 116, 121]. Aus den bis zu 100 verschiedenen Proteinspots, die dabei in zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophoresen gefunden wurden [82], konnten diverse Proteine identifiziert werden. So fanden van Gestel *et al.* [121] in den DRMs aus Ejakulatspermien des Ebers unter anderem das Spermadhesin AQN-3.

2.6 Ergebnisse der Vorversuche des Projektes

In den Vorversuchen des Projektes wurden im Rahmen einer Diplomarbeit [41] verschiedene Detergenzien auf ihre Wirkung auf die Spermienmembranen und ihren möglichen Einfluss auf die geplanten Analysemethoden untersucht. In dieser Diplomarbeit sowie in Jakop *et al.* [43] lässt sich eine genaue Beschreibung der verwendeten Detergenzien finden. Bei lichtmikroskopischen Analysen von mit den Detergenzien behandelten Spermien wurde festgestellt, dass die unterschiedlichen Detergenzien differenzierte Wirkungen auf die Spermienmembranen zeigen: Bei einer lichtmikroskopischen Untersuchung sieht man, ob die

Membranen im akrosomalen Bereich des Spermienkopfes intakt sind, sich in Ablösung befinden oder bereits vollständig abgelöst sind (siehe **Abbildung 8**). Die Kontrollprobe besaß nach einer 30-minütigen Inkubation bei 38°C einen Anteil von 93% Spermien mit intakten Membranen. Das gleiche Bild ließ sich auch nach einer Behandlung mit Pluronic F-127 feststellen. Eine Inkubation bei 4°C zeigte bei diesen beiden Behandlungsmethoden das gleiche Ergebnis, die Temperatur hatte anscheinend keinen Einfluss. Bei den übrigen Detergenzien war der Anteil abgelöster Membranen bei der höheren Temperatur stets stärker. Außerdem ließ sich feststellen, dass wie erwartet, die Schäden an den Kopfmembranen der Spermien mit sinkendem HLB-Wert (*hydrophilic-lipophilic-balance*) der nicht-ionischen Detergenzien zunahmen. Auch die Art der Ablösung war teilweise unterschiedlich. Während sich beispielweise bei mit CHAPS oder Triton X-100 behandelten Spermien die Membranen in einer scharfen Linie ablösten, erzeugte dieser Prozess bei mit Tween 20 behandelten Spermien eher ein diffuses Bild der sich ablösenden Membran, wobei teilweise punktförmige Strukturen beobachtet werden konnten. Zu bemerken ist vor allem noch, dass die Membranen nie vollständig abgelöst wurden, eine zusätzliche mechanische Behandlung für die Präparation der Membrandomänen erschien somit angebracht.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten ein ähnliches Bild. In den Kontrollen konnten Spermien mit intakten Membranen beobachtet werden, obwohl auch Zellen gefunden wurden, die zumindest teilweise abgelöste Membranen besaßen, was vermutlich auf die Wasch- und Dehydrationsbehandlungen während der Präparation für die Elektronenmikroskopie zurückzuführen war. Die anscheinend fast protektive Wirkung des Pluronic F-127 ließ sich in der Elektronenmikroskopie bestätigen. Bei den anderen Detergenzien konnten sich ablösende Membranen sowohl in den Kopf- als auch den Schwanzregionen beobachtet werden. Obwohl keine quantitative Auswertung durchgeführt wurde, nahmen auch bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung die Schäden mit sinkenden HLB-Werten der Detergenzien zu. Die stärksten Schäden rief Brij 96V hervor, bei dem bereits Veränderungen an der Kernmembran beobachtet werden konnten. Die sich ablösenden Membranen erschienen in der Elektronenmikroskopie als löchrige, raue, sich auflösende Strukturen. Eine Besonderheit stellte das Tween 20 dar, bei dem sich vesikelartige Strukturen mit einem Durchmesser von 50-200 nm gebildet hatten. Vor allem für die postakrosomalen Bereiche konnten bei allen Detergenzien auch Spermien mit intakten Membranbereichen gefunden werden. Alle Detergenzien zeigten somit unterschiedliche Wirkungen auf die Spermienmembranen, was zusätzlich noch durch die individuellen Spermien und vor allem auch die beobachtete Spermienregion beeinflusst war [41, 43].

Schließlich wurde der Einfluss der Detergenzien auf die nachfolgenden Analysemethoden untersucht. Die quantitativen Bestimmungen des Cholesterol-, Phospholipid- und Proteingehalts werden nicht durch die Anwesenheit der Detergenzien beeinflusst. Allerdings stellte sich heraus, dass die geplanten MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser-desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry*) Untersuchungen stark von den Detergenzien gestört werden, da die Detergenzien überwiegend molekulare Massen besitzen, die genau im Bereich der zu untersuchenden Lipide liegen. In der Kontrolle ohne Detergenz (**Abbildung 7, (a)**) können deutlich die typischen Lipide von Eberspermien detektiert werden: Cholesterol ($m/z = 369,3$), die H^+ - und Na^+ -Addukte des GPC 16:0 alkenyl/22:6 acyl ($m/z = 790,6$ und $812,6$) sowie des GPC 16:0 alkyl/22:6 acyl ($m/z = 792,6$ und $814,6$) und des GPC 16:0 alkyl/22:5 acyl ($m/z = 794,6$ und $816,6$). Bei der Störung durch die Detergenzien kommt hinzu, dass es sich bei den meisten Detergenzien um ein Gemisch aus Molekülen mit unterschiedlichen Kettenlängen und somit auch Molmassen handelt, und daher das Spektrum von einer Reihe von Störsignalen überlagert wird, was beispielsweise beim Triton X-100, Tween 20 und Brij 96V beobachtet werden kann (**Abbildung 7, (d)-(f)**). Neben diesen Störsignalen tritt außerdem bei einigen Detergenzien der Effekt auf, dass die Signale einiger Lipide mehr oder minder stark unterdrückt werden. So ließ sich beim Triton X-100 kein Cholesterolpeak mehr beobachten (**Abbildung 7, (d)**). Beim Natriumcholat war ebenfalls kein Cholesterolpeak sichtbar und die Peaks der H^+ -Addukte schienen unterdrückt (**Abbildung 7, (b)**). Beim CHAPS konnten keinerlei Lipidpeaks beobachtet werden (**Abbildung 7, (c)**). Somit scheinen vor allem die geladenen Detergenzien CHAPS und Natriumcholat die stärksten Effekte bei der Unterdrückung der Lipidpeaks zu zeigen (nach Jakop *et al.* [43]).

Eine Alternative zu den massenspektrometrischen Untersuchungen stellt die ^{31}P -NMR (Kernspinresonanzspektroskopie) dar. Mit dieser Methode können die elektronische Umgebung von Atomen und ihre Wechselwirkungen mit den Nachbaratomen untersucht werden. Es lassen sich dabei alle Kerne außer g/g-Kernen beobachten, da die Methode auf dem magnetischen Moment der Atomkerne basiert. In der Lipidanalytik findet dabei ^{31}P Verwendung, sodass man anhand der Spektren die einzelnen Lipide eines Phospholipidgemisches qualitativ und quantitativ unterscheiden kann. Werden allerdings so komplexe Proben wie eine Zellmembran untersucht, kann nur eine Differenzierung der einzelnen Lipidklassen (nach den Kopfgruppen) stattfinden. Eine genaue Analyse der einzelnen Lipide mit ihren spezifischen, gebundenen Fettsäureresten ist, vor allem auch aufgrund der häufig geringen Probenmengen, nicht möglich. Dafür erlaubt diese Methode aber nach Zusatz eines internen Standards eine quantitative Auswertung der

Probenzusammensetzung, während bei der MALDI-TOF MS keine direkte quantitative Auswertung möglich ist. Lediglich das Verhältnis einzelner Peakintensitäten ermöglicht eine quantitative Aussage über die Probenzusammensetzung innerhalb einzelner Spektren. Somit werden die Absolutmengen am besten über die NMR, die relativen Anteile der einzelnen Fettsäurereste aber am besten über die MS bestimmt.

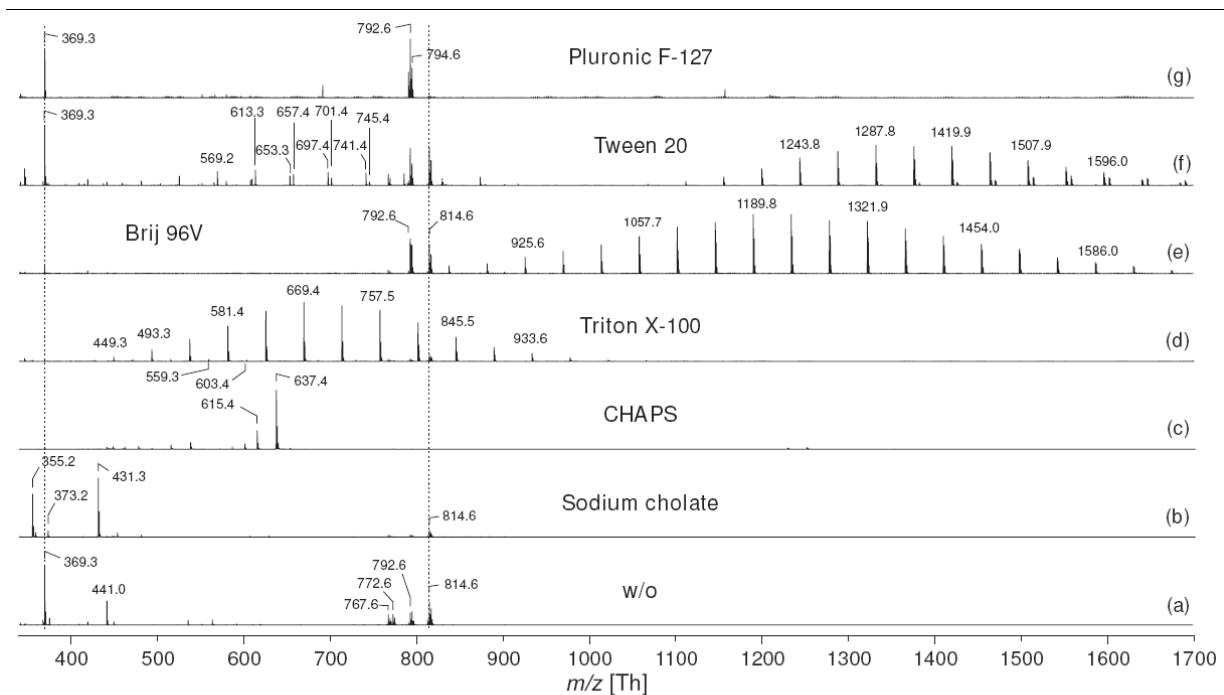


Abbildung 7: Positiv-Ionen MALDI-TOF MS (DHB) eines Lipidextrakts aus Eberspermien ohne (a) und mit folgenden zugesetzten Detergenzien: Natriumcholat (b), CHAPS (c), Triton X-100 (d), Brij 96V (e), Tween 20 (f), Pluronic F-127 (g) (aus Jakop *et al.* [43]). Man sieht die störenden Peaks einiger Detergenzien ebenso wie die Peakunterdrückung der Lipidpeaks in einigen mit Detergenz versetzten Proben

2.7 Ziele dieser Studie

Detergenzresistente Membrandomänen (DRMs) spiegeln Membraneigenschaften wider. Auch wenn es sich hierbei um eine artifizielle Selektion von Lipiden und Proteinen handelt, sind Zusammenhänge zu *in vivo* existenten Strukturen bei Spermien belegt. Daher sollte die Analyse der DRMs aus Spermien verschiedener Reifestadien (Nebenhodenabschnitte, Ejakulatspermien) und des Seminalplasmas die Frage klären, ob es Veränderungen der Membrandomänen während der Reifung der Spermien gibt. Der Fokus der Studie lag dabei auf der Analyse der Lipide.

In einer weiteren Untersuchung wurden die Ejakulate von 64 Ebern einer Eberstation auf ihre Kälteempfindlichkeit getestet. Anhand von ausgewählten Tieren sollte anschließend geklärt werden, ob sich eine Ursache einer möglichen Kältetoleranz in den Membrandomänen der Eberspermien finden lässt. Denn sollten DRMs oder DRM-Bestandteile eine funktionale Bedeutung haben, werden in ihrer Zusammensetzung Veränderungen erwartet.

Dazu musste die Methode der Isolierung von DRMs für Säugerspermien am Beispiel von Eberspermien etabliert werden. Unter anderem wurde überprüft, welche unterschiedlichen Ergebnisse verschiedene Detergenzien lieferten. Auch die sich anschließenden Analytikmethoden (Lipidextraktion, Cholesterolbestimmung, Phospholipidbestimmung, ^{31}P -NMR, Dünnschichtchromatographie, MALDI-TOF MS, Proteinbestimmung, SDS-PAGE, Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie nach Trypsinverdau) wurden für die Untersuchung von DRMs aus Eberspermien angepasst.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Produktnr	Firma
	.	
Aceton (C_3H_6O)	9372.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
9-Aminoacridin	AC13441	Acros Organics (Fisher Scientific GmbH)
Acetonitril (C_2H_3N)	14261	Fluka Feinchemikalien GmbH
Acrylamid : Bisacrylamid-Gellösung (37,5 : 1)	10681	Serva Electrophoresis GmbH
Aluminiumsulfat-16-Hydrat ($Al_2(SO_4)_3 \times 16 H_2O$)	36,845-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniummolybdat ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$)	13370	Serva Electrophoresis GmbH
Amplex-Cholesterol-Bestimmungs-Kit	A12216	Invitrogen Life Technologies GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	A-3678	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ascorbinsäure ($C_6H_8O_6$)	A5960	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bicinchoninsäure (BCA- Na_2)	D8284	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bromphenolblau	15375.01	Serva Electrophoresis GmbH
BTS-Ebersamenverdünner mit Antibiotikum	13525	Minitüb GmbH
Chloroform ($CHCl_3$)	3313.2	Carl Roth GmbH & Co. KG

Cholesterolkkit	E013905	r-Biopharm AG
Coomassie Blue (CBB G-250)	27815	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	39319	Fluka Feinchemikalien GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	154938	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O)	1.06580	Merck KGaA
Dithiothreitol (DTT)	6908.3	Carl Roth GmbH & Co. KG
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	D8537	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
EDTA	11280	Serva Electrophoresis GmbH
Essigsäure (Eisessig, C ₂ H ₃ OOH)	3738.4	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	5054.3	Carl Roth GmbH & Co. KG
Formaldehydlösung (37%)	F-1268	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glutaraldehyd, 25%	R1020	Agar Scientific, Essex, England
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	G-5150	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glyzin (C ₂ H ₅ NO ₂)	3790.2	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hepes (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	25245	Serva Electrophoresis GmbH
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	8175	J. T. Baker, Mallinckrodt Baker
Kupfer-(II)-sulfat (CuSO ₄ x 5 H ₂ O)	8175.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol (CH ₃ OH)	8402	J. T. Baker, Mallinckrodt Baker
Natriumchlorid (NaCl)	3957.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃ x 10 H ₂ O)	106384	Merck KGaA

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	6329	Merck KGaA
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	S-5011	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	2326.2	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydroxid (NaOH)	6771.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumtartrat-Dihydrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	1.06663	Merck KGaA
ortho-Phosphorsäure (H_3PO_4)	1.00573	Merck KGaA
Perchlorsäure (60%)	1.00518	Merck KGaA
Prestained Protein Ladder	SM0671	Fermentas GmbH
Primulin	206865	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Saccharose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	35580	Serva Electrophoresis GmbH
Konzentrierte Schwefelsäure (H_2SO_4)	4623.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Suidil-Ebersamenverdünner Antibiotikum	mit EX75DS	Ibersan, SA, Portugal
Triethylamin (TEA)	90335	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TEMED	2367.3	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris Base	T-1503	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris-HCl	9090.3	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100	93426	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

3.2 Präparation von Ejakulatspermien und Qualitätsbeurteilung

Die Ejakulatspermien wurden von Ebern aus einer Besamungseberstation (Hermitage Deutschland GmbH Besamungseberstation, Golzow) und von Versuchstieren des Instituts für

Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere (IFN) Schönnow e. V. bezogen. Für die Verdünnung des Eberspermas wurde der BTS-Ebersamenverdünner (**Tabelle 2**) oder der Suidil-Ebersamenverdünner für die Flüssigkonservierung bei 16°C - 18°C verwendet. Von den verwendeten Eberspermien wurde stets eine Motilitätsanalyse mittels des CASA Systems „SpermVision“ (Minitüb, siehe 3.2.1) durchgeführt und die Zellzahl bestimmt. Nach Fixierung der Spermien 1+1 (v+v) mit 1%iger Formaldehyd-Lösung (0,1 ml 37%iges Formaldehyd mit 3,6 ml PBS) wurde jeweils die Qualität der Kopfkappen mikroskopisch (1000 fache Vergrößerung, Phasenkontrast, mit Immersionsöl) untersucht. Es wurde zwischen intakten Kopfkappen, Kopfkappen mit Membranen in Ablösung und Spermien mit abgelösten Kopfkappen unterschieden (siehe **Abbildung 8**). Dabei wurden jeweils 100 Spermien ausgezählt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des BTS-Ebersamenverdünners

Beltsville-Thawing-Lösung (BTS)	[mM]
NaHCO ₃	15
Na-Citrat	23
KCl	10
Glukose	205
EDTA	3,7
Gentamicin (260 µg/ml; MW: 478 g/mol)	0,544
pH-Wert ≈ 7,4	
Osmolarität: 300mOsmol	

Vor der weiteren Behandlung wurden die Spermien (flüssigkonservierte Eberspermien, 24 Stunden gelagert) zweimalig durch Zentrifugation (700 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur, Beschleunigung/Bremse auf 50% reduziert) und anschließende Resuspension in Hepes-Puffer (HBS: 150 mM NaCl, 5 mM Hepes, pH 7,4) gewaschen und auf eine Zellzahl von etwa 10⁹ Spermien pro Milliliter eingestellt. Eine Kontrollprobe (= „nativ“, 100 µl Spermien suspension) wurde bei -80°C eingefroren.



Abbildung 8: Lichtmikroskopische Bilder von Eberspermien - a) Spermien mit intakten Kopfkappen (N), b) Spermien mit sich ablösenden Membranen (KK/m), c) Spermium mit vollständig abgelöster Membran (KK/om) (aus [41])

3.2.1 Analyse der Morphologie

Die Spermien wurden durch 1+1 Mischen mit 1% Formaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Spermien mikroskopisch (1000fache Vergrößerung, Phasenkontrast, mit Immersionsöl) untersucht. Es wurden stets 200 Spermien ausgezählt. Folgende Kriterien wurden dabei unterschieden:

N: Spermium mit normaler Morphologie

K: morphologische Veränderung des Spermienkopfes (Größe)

KK: Kopfkappenveränderungen

M: Veränderungen des Mittelstücks

PP: proximaler Plasmotropfen

DP: distaler Plasmotropfen

PS: Schleifenbildung des Schwanzes durch Plasmotropfen

S: Veränderungen des Spermienschwanzes

MB: Mehrlingsbildung

3.2.2 Motilitätsanalyse

Die Motilitätsanalyse der Spermien wurde mit dem CASA System „SpermVision“ (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) durchgeführt. Die Spermien wurden 10 Minuten bei 38°C inkubiert. Anschließend wurden 2,6 µl in eine Leya-Zählkammer ("Standard Count", 20 µm, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) gefüllt und sofort für die Analyse eingesetzt. Dabei wurde das voreingestellte Programm für die Analyse von Eberspermien eingesetzt. Für die

Auswertung wurden die Motilität, d. h. der prozentuale Anteil beweglicher Spermien, sowie die progressive Motilität, d. h. der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien, einbezogen.

3.3 Screening auf Kälteresistenz in Eberspermien

Die Arbeiten zum Screening der Eber ejakulate wurden in Kooperation mit dem Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere (IFN) Schönnow e. V. durchgeführt. Die flüssigkonservierten Spermien wurden nach dem Transport von der Eberstation bei 16°C und Parallelproben des gleichen Ejakulats bei 4°C (Kühlschrank) gelagert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde jeweils ca. 1 ml der Proben für 10 Minuten bei 38°C in offenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen erwärmt und anschließend die Motilität bestimmt (siehe 3.2.2). Nach 48 Stunden erfolgte mit dem Durchfluscytometer die Analyse des Membranstatus (siehe 3.3.1). Ebenfalls nach 48 Stunden wurde außerdem ein Thermoresistenztest durchgeführt. Dafür wurde ca. 1 ml Spermien suspension für 300 Minuten bei 38°C in offenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen inkubiert und anschließend die Motilität bestimmt. Nach 72 Stunden wurden Proben fixiert und anschließend die Morphologie der Kopfkappen ausgezählt (siehe 3.2). Außerdem wurden die Proben mikrobiologisch analysiert (siehe 3.3.2).

Insgesamt wurden die Ejakulate von 64 verschiedenen Ebern untersucht. Bei den acht Ebern, die später für die Lipid- und Proteinanalytik selektiert wurden, wurden mindestens jeweils sieben verschiedene Ejakulate zum Screening analysiert.

3.3.1 Analyse des Membranstatus der Spermien

Die Analyse des Membranstatus der Spermien wurde von Frau Anita Retzlaff (IFN-Schönnow e. V.) durchgeführt. 500 µl formolfixierte Spermien (375 µl flüssigkonserviertes Sperma + 125 µl 0,5%iges Formol-pNaCl, siehe **Tabelle 3**) wurden mit den folgenden Fluorochromen markiert: Propidiumjodid (PI, Invitrogen), Fluorescein-Isothiocyanat-gekoppeltes Erdnuss Agglutinin (FITC-PNA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und Fluorescein-Isothiocyanat-gekoppeltes *Pisum sativum* Agglutinin (FITC-PSA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Die eingesetzten Konzentrationen, Volumina und Einwirkzeiten sind in **Tabelle 4** zu finden. Für die Messung wurden 10 µl gefärbte Spermien in 2 ml auf 38°C temperierter pNaCl-Lösung (**Tabelle 3**) resuspendiert. Die Färbung der Spermien wurde mit einem Durchfluscytometer (Particle Analysing System, Fa. Partec, Münster) gemessen. Das Durchfluscytometer war mit

einem Argon-Ionen-Laser (200 mW, 488 nm) ausgestattet. Die Messung erfolgte mit den Filtern FL-1 (TK500/TK560: BP 500-560 nm, EM 520 DF50) und FL-3 (TK560/TK610: LP>610 nm, RG 630). Nur Spermien, die für alle Fluorochrome negativ waren, wurden als membranintakt gewertet. Die Auswertung erfolgte mit der Flomax Software Version 2.0. Eine sehr detaillierte Beschreibung dieser Methode lässt sich in der Doktorarbeit von Dr. Martin Schulze [100] finden.

Tabelle 3: Zusammensetzung verwendeter Lösungen bei der Bestimmung des Membranstatus der Spermien

pNaCl-Lösung (pH 7,0)		0,5%iges Formol-pNaCl
0,5 M Na ₂ HPO ₄	16,1 ml	0,5 ml 37% Formaldehyd in 100 ml pNaCl-Lösung
0,5 M NaH ₂ PO ₄	8,9 ml	
ad 100 ml mit H ₂ O		
+ 200 ml 0,9% NaCl-Lösung		

Tabelle 4: Konzentrationen, Zugabevolumina und Einwirkzeiten der eingesetzten Fluorochrome bei der Bestimmung des Membranstatus der Spermien

Fluorochrom	Konzentration [mg/ml]	Zugabe [μ l]	Einwirkzeit [Minuten]
PI	0,1	12,5	10
FITC-PNA	0,5	2,5	10
FITC-PSA	1	5	5

3.3.2 Mikrobiologische Untersuchung der Ejakulate

Die mikrobiologische Analyse der Ejakulate wurde von Frau Anita Retzlaff (IFN-Schönow e. V.) durchgeführt. Nach 48 Stunden wurde mit 100 μ l der flüssigkonservierten Spermien eine Nähragarplatte beimpft. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert und nach 4 und 48 Stunden die Anzahl Kolonie-bildender Einheiten (KBE) ausgezählt und anschließend gemittelt.

3.4 Präparation von Nebenhodenspermien

Die Nebenhodenspermien wurden aus Schlachthofmaterial von den Schlachthöfen in Neuruppin, Teterow, Kasel-Golzig und Weißenfels gewonnen. Dabei wurden die Hoden der Tiere noch im Schlachthof abgetrennt und gekühlt ins Institut transportiert. Noch am Schlachttag oder am Folgetag wurden aus dem Material die Nebenhoden präpariert und von anhängendem Fettgewebe und Blutgefäßen befreit. Es wurden jeweils ein bis vier Paar Hoden präpariert und die gewonnen Spermien gepoolt. Insgesamt wurden für die Untersuchungen der Caudaspermien ein Pool aus Spermien von sieben Ebern, bei den Caput- und Corpusspermien jeweils ein Pool aus Spermien von drei Ebern untersucht. Anschließend wurden die Abschnitte des Caput, des Corpus und der Cauda des Nebenhodens voneinander getrennt und in Petrischalen mit HBS in kleine Stückchen zerteilt, um die Spermien zu gewinnen. Mittels Kleenex-Tüchern in einem Glastrichter wurden restliche Gewebestücke von den Spermien abgetrennt. Die Motilität der Spermien wurde bestimmt. Durch Zentrifugation (700 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur, Beschleunigung/Bremse auf 50% reduziert) und Resuspension in HBS wurden die Spermien gewaschen. Eine Kontrollprobe (= „nativ“, 100 µl Spermiesuspension) wurde weggefroren. Mit der restlichen Probe wurden die Zellzahl bestimmt, die Morphologie ausgezählt und die Präparation detergenzresistenter Membrandomänen (siehe 3.8) durchgeführt.

3.5 Gewinnung und Aufarbeitung von Seminalplasma

Für die Gewinnung von Seminalplasma wurde das frische Ejakulat bei 1000 x g für 10 Minuten zentrifugiert (= SP I) und der Seminalplasmaüberstand bei 4°C gelagert. Am Folgetag erfolgte eine zweite Zentrifugation (2260 x g, 20 Minuten, 4°C), um restliche Spermien zu entfernen (= SPII).

Zur Gewinnung von Seminalplasmavesikeln wurde eine Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge Beckmann Optima XL-70, Rotor SW 28, 120.000 x g, zwei Stunden, 4°C) in Ultra Clear™ Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann Coulter, Germany) durchgeführt. Ein Teil des dabei entstehenden Pellets wurde für eine elektronenmikroskopische Untersuchung verwendet und in 400 µl 3% Glutaraldehyd gegeben, der Rest wurde für die Präparation detergenzresistenter Membrandomänen eingesetzt und mit HBS auf 3 ml Volumen aufgefüllt. Nach Zugabe von 3 ml 2%igem Triton X-100 wurde das Pellet zehnmal mit dem Potter zerkleinert, 30 Minuten

auf Eis inkubiert und noch einmal zehn Stöße mit dem Potter durchgeführt. Die weitere Aufarbeitung und die Ultrazentrifugation erfolgten wie bei den Spermien (siehe 3.8) beschrieben.

3.6 Inkubation von Nebenhodenspermien mit Seminalplasma

Die frisch präparierten Nebenhodenspermien (siehe 3.4) aus den Caudae von vier Ebern wurden auf fünf Aliquots aufgeteilt (Spermienpool mit 44 Milliarden Spermien absolut in 120 ml). Nach der Zentrifugation (700 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur, Beschleunigung/Bremse auf 50% reduziert) wurde der Überstand (HBS) komplett entfernt und die Spermien in Seminalplasma resuspendiert (Volumina und Konzentrationen siehe **Tabelle 5**). Es folgte eine Inkubation von 30 Minuten bei 37°C mit einer anschließenden Motilitätsbestimmung (siehe 3.2.2). Anschließend wurden jeweils 1 Milliarde Spermien aus den Proben entnommen und mit 60 ml BTS-Verdünner mit Gentamycin resuspendiert. Diese flüssigkonservierten Spermien wurden auf zwei Spermaflaschen aufgeteilt und eine Flasche bei 16°C, die andere bei 4°C gelagert. Aus den verbleibenden Spermien ohne Verdünner wurden detergenzresistente Membrandomänen (siehe 3.8) präpariert. Parallel wurde eine Kontrollprobe ohne Inkubation in Seminalplasma aufgearbeitet.

Tabelle 5: Seminalplasmamengen und Spermienkonzentrationen im Seminalplasma: Es wurden jeweils 8,8 Milliarden Spermien absolut im angegebenen Seminalplasmavolumen (Spalte zwei) resuspendiert. Spalte drei gibt die Konzentration der Spermien im Versuch an. In Spalte vier ist die originale Spermienkonzentration im Ejakulat des jeweiligen Seminalplasmas angegeben, aus dem das Seminalplasma gewonnen wurde.

Seminalplasma von Eber	Volumen Seminalplasma [ml]	Konzentration Nebenhodenspermien [x10 ⁹ Spermien/ml]	der Originale Spermienkonzentration des Seminalplasmas im Ejakulat [x10 ⁹ Spermien/ml]
Max 27	16*	0,550	0,339
Max 46	27	0,326	0,318
Max 61	50	0,176	0,465
Max 163	50	0,176	0,145

* aus Mangel an Seminalplasma (Eber zum Versuchszeitpunkt bereits verstorben) war kein größeres Volumen möglich

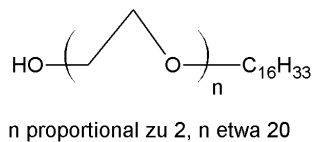
3.7 Präparation detergenzresistenter Membrandomänen mit verschiedenen Detergenzien

Es wurden neun verschiedene Detergenzien (**Tabelle 6** und **Tabelle 7**) und eine Präparation ohne Detergenz zuvor für die Präparation von DRMs aus Eberspermien getestet.

Tabelle 6: Strukturformeln der verwendeten Detergenzien; weitere chemische Eigenschaften lassen sich in Tabelle 7 sowie der Diplomarbeit Jakop, 2007 [40] finden.

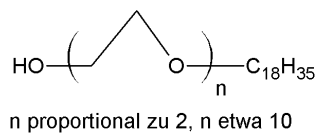
Brij 58 P

Polyethylenglycolhexadecylether,
Polyoxyethylen-20-cetylexer



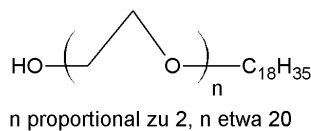
Brij 96 V

Decaethylenglycololeylether



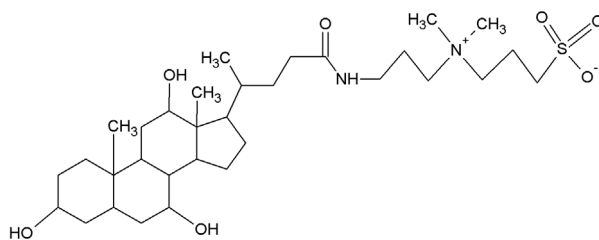
Brij 98

Polyoxyethylen-20-oleylether



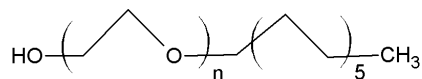
CHAPS

3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat



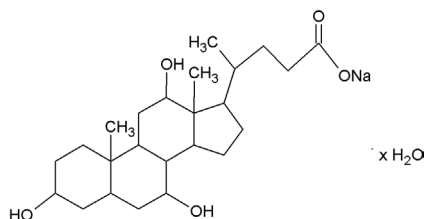
Thesit

Polyethylenglycoldodecylether



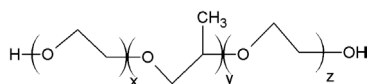
Natriumcholat Hydrat

Cholsäure Natriumsalz

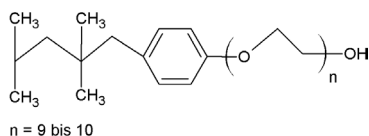


Pluronic F-127

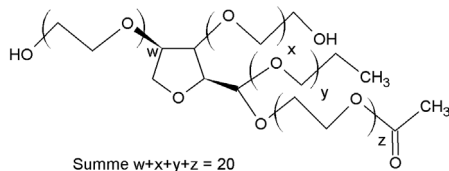
Polyethylenpolypropylenglycol

**Triton X-100**

4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglycol

**Tween 20**

Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat

**Tabelle 7: Konzentrationen, Bestellnummern, Kopfgruppenladung, HLB-Werte und Molmassen der verwendete Detergenzien**

Detergenz	Bestellnummer bei Sigma Aldrich Chemie GmbH	Endkonzentration in den Proben (w/w)	Kopfgruppen- ladung	HLB-Wert	(Durchschnittliche) Molmasse [g/mol]
Brij 58P	16004	1 %	nichtionisch	15,7	1122
Brij 96V	16011	1 %	nichtionisch	12,4	709
Brij 98	P5641	1 %	nichtionisch	15,3	1150
CHAPS	26680	4 %	zwitterionisch		615
Thesit	88315	0,5 %	nichtionisch	13,3	583
Natriumcholat	27029	1 %	anionisch	18	431
Pluronic F-127	P2443	2 % ^{*)}	nichtionisch	18 bis 23	12600
Triton X-100	93426	1 %	nichtionisch	13,5	625
Tween 20	93773	1 %	nichtionisch	16,7	1228

^{*)} Pluronic F-127 wurde zuerst in Dimethylsulfoxid (200 mg/ml) gelöst und dann 1:5 mit HBS verdünnt.

Bei den Detergenzien wurden zwei geladene und sieben nichtionische Detergenzien mit unterschiedlichen HLB-Werten eingesetzt. Diese sogenannte hydrophile-lipophile Balancezahl (HLB-Wert) beschreibt die Hydrophilität des jeweiligen Detergenz. Je größer dieser Wert ist, desto hydrophiler ist das entsprechende Detergenz. Die angegebenen Molmassen sind für einige Detergenzien nur Durchschnittswerte, da es sich häufig um ein

Molekülgemisch mit unterschiedlich langen Seitenketten handelt. Dies wird auch aus den Strukturformeln (**Tabelle 6**) und aus den Massenspektren in der Einleitung (**Abbildung 7**) ersichtlich.

Um die morphologische Wirkung der Detergenzien auf die Spermienmembranen zu untersuchen, wurden gewaschene Spermien 1+1 (v+v, Spermienendkonzentration 0,5 bis $1 \cdot 10^9$ Spermien pro Milliliter) mit den in **Tabelle 7** aufgeführten Detergenzien gemischt, 30 Minuten bei 4°C und 38°C inkubiert und anschließend mit dem Lichtmikroskop die Morphologie der Kopfkappen (siehe 3.2) untersucht.

Für die Präparation der DRMs wurden die gewaschenen Ejakulatspermien 1+1 (v+v, Spermienendkonzentration 0,5 bis $1 \cdot 10^9$ Spermien pro Milliliter) mit den in **Tabelle 7** aufgeführten Detergenzien gemischt, 30 Minuten auf Eis inkubiert und mit zehn Hüben eines Potters (15 ml Wheaton Dounce Tissue Grinder, Fisher Scientific GmbH) mechanisch aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation (1300 x g, 5 Minuten, 4°C) wurden 200 µl des Überstands bei -20°C als Kontrolle eingefroren. Der Rest wurde ebenfalls bei -20°C bis zur Ultrazentrifugation gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben 1+1 (v+v) mit 80%iger Saccharoselösung in HBS gemischt und davon 5 ml unter einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (40% - 20% Saccharose in HBS, ca. 10 ml) in Ultra Clear™ Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann Coulter) geschichtet. Über Nacht erfolgte eine Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge Beckmann Optima XL-70, Rotor SW 40 Ti, 100.000 x g, 18 Stunden, 4°C). Die erhaltenen Gradienten wurden fotografiert und eventuell entstandene Bandenmuster gezeichnet. Die sichtbaren Banden wurden gezielt mit einer Spritze mit Kanüle abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Die Bandenbezeichnung erfolgte dabei aufsteigend von oben nach unten (siehe **Abbildung 9**).

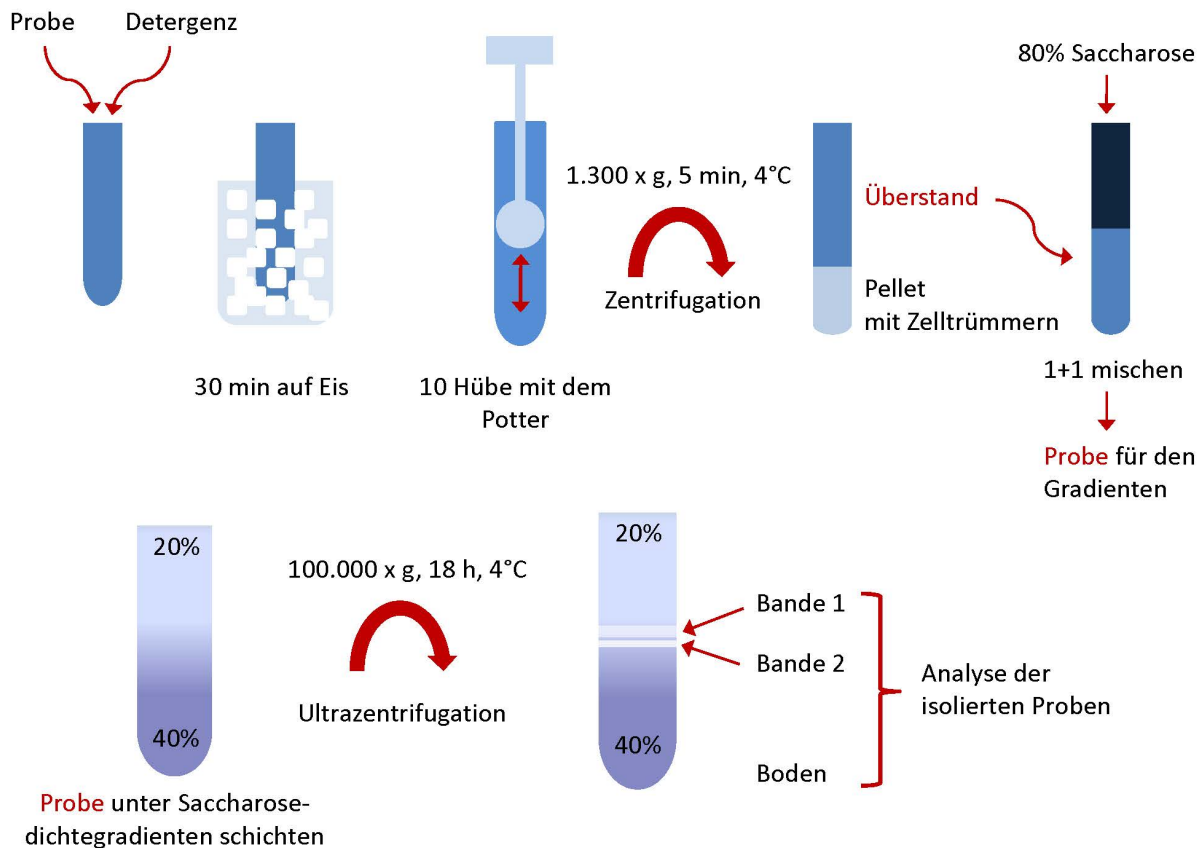


Abbildung 9: Versuchsschema zur Isolierung der detergentenresistenten Membrandomänen (DRMs) aus Eberspermien

3.8 Präparation von detergentenresistenten Membrandomänen mit Triton X-100 aus Ejakulat- und Nebenhodenspermien

Die frisch gewaschene Spermiesuspension (ca. 10^9 Spermien pro Milliliter in HBS) wurde mit dem gleichen Volumen an 2% Triton X-100 in HBS (4°C) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit einem Potter durch zehn Hübe eine mechanische Abstreifung der abgelösten Membranen durchgeführt. Durch eine Zentrifugation (1300 x g, 5 Minuten, 4°C) wurden die Zellkerne und restliche Zelltrümmer entfernt. Der Überstand mit den abgelösten Membranen wurde bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren, wobei als Zwischenkontrolle 200 µl Überstand weggefroren wurden („Ü“). Nach dem Auftauen wurde er mit 80%iger Saccharoselösung in HBS 1+1 (v+v) gemischt und 5 ml unter einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (40 - 20% Saccharose in HBS, ca. 10 ml) in Ultra Clear™ Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann Coulter, Germany) geschichtet. Über Nacht erfolgte eine Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge Beckmann Optima XL-70, Rotor

SW 40 Ti, 100.000 x g, 18 Stunden, 4°C). Die erhaltenen Gradienten wurden fotografiert und entstandene Bandenmuster gezeichnet. In etwa 1 - 1,5 ml Fraktionen wurden die Gradienten von oben nach unten abgenommen, sodass möglichst jede komplette Bande in einer Fraktion vorlag. Die sichtbaren Banden wurden sofort für die weiteren Analysen (Lipidextraktion, Cholesterolbestimmung, Proteinbestimmung, SDS-PAGE) aliquotiert und das Volumen dokumentiert. Alle Proben wurden bis zu den weiteren Analysen bei -80°C gelagert.

3.9 Lipidextraktion

Die Lipidextraktion erfolgte nach dem Protokoll von Bligh und Dyer [6]. Alle Arbeiten mit Lösungsmitteln (insbesondere chlorierten Kohlenwasserstoffen) wurden in Glasgefäßen durchgeführt. Eine Ausnahme bildeten die Pipettenspitzen beim abschließenden Aliquotieren. Es wurden 400 µl Spermiesuspension mit 1,5 ml Methanol/Chloroform (1+2, v+v) gemischt und eine Minute mit dem Vortex gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,5 ml Chloroform zugegeben und erneut 30 Sekunden mit dem Vortex gemischt. Nach Zugabe von 0,5 ml 40 mM Essigsäure und weiteren 30 Sekunden Mischen mit dem Vortex wurde 20 Minuten bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Die untere Phase (Chloroform-Phase) wurde mit einer Pasteurpipette in ein graduiertes Schliffröhrchen überführt. Zur restlichen Probe (wässrige Phase mit ausgefallenen Proteinen) wurde erneut 1 ml Chloroform gegeben und eine Minute mit dem Vortex gemischt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 1000 x g und 4°C wurde erneut die untere Phase abgenommen und mit der ersten Chloroform-Phase vereinigt. Es wurde das Volumen in den graduierten Röhrchen bestimmt. Die Probe wurde für die weiteren Untersuchungen (Cholesterolbestimmung, Phosphatbestimmung, NMR, MALDI-TOF MS) zu gleichen Teilen aliquotiert und die Volumina dokumentiert. Das Chloroform wurde bei 40°C unter Stickstoff abgedampft und die Proben bei -20°C eingefroren.

3.10 Biochemische Lipidbestimmungen

3.10.1 Phosphatbestimmung zur Bestimmung des Phospholipidgehalts

Zu den vollständig abgedampften Proben und den Standardproben mit 50, 100, 150, 200 und 250 µl 4 µM Phosphatstandard (entspricht 20, 40, 60, 80 und 100 nmol Phosphat; für 40 mM Stammlösung wurden 712 mg $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Reinstwasser gelöst) wurden

jeweils 400 µl Perchlorsäure gegeben. Die Proben wurden 30 – 120 Minuten bei 200°C bis zur vollständigen Entfärbung verascht. Nach dem Abkühlen wurden 4 ml Molybdatreagenz (2,2 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 14,3 ml konzentrierte Schwefelsäure auf 1 l mit Reinstwasser) und 500 µl 10%ige Ascorbinsäure (frisch mit phosphatfreiem Wasser angesetzt) zugegeben und mit dem Vortex gemischt. Nach 10 Minuten bei 100°C wurde die Farbreaktion im Eiswasserbad gestoppt. Mit dem Photometer (UV-160A, Shimadzu Deutschland GmbH) wurde die Absorption bei 812 nm bestimmt und anhand der Standardkurve die Konzentration in den Proben berechnet.

3.10.2 Cholesterolbestimmung (r-Biopharm Kit)

Die Bestimmung der Cholesterolmenge aus den Kontrollproben (Überstände und native Spermien) erfolgte mit dem Cholesterolkit von r-Biopharm entsprechend den Angaben des Herstellers. Die abgedampften Proben wurden in 160 µl Isopropanol gelöst und eine Standardreihe mit 0, 10, 20 und 40 µl des mitgelieferten Cholesterolstandards (entspricht 0; 25,86; 51,72 und 103,44 nmol Cholesterol) erstellt, wobei bei den Standardproben das Volumen mit Isopropanol auf 160 µl aufgefüllt wurde. Von Lösung 4, die eine Stunde vor Versuchsbeginn aus den mitgelieferten Lösungen 1 und 2 erstellt wurde (je Probe 1,2 ml Lösung 1 und 0,8 ml Lösung 2), wurden 2 ml zu jeder Probe und zu den Standardproben gegeben. Mit dem Vortex wurde gemischt und 1 ml der Proben in ein zweites Schliffreagenzglas überführt (Probe B, verbleibende Probe = Probe A). Zu den Proben B wurden jeweils 8 µl der mitgelieferten Lösung 3 (Enzym) pipettiert und gemischt. Nach 60 Minuten bei 37°C wurde in Acryl-Halbmikroküvetten die Absorption (Photometer UV-160A, Shimadzu Deutschland GmbH) der Probe B gegen die der Probe A bei 405 nm gemessen und anhand der Standardproben die Cholesterolkonzentration in den Proben berechnet.

3.10.3 Cholesterolbestimmung (Amplex Kit)

Die Bestimmung der sehr kleinen Cholesterolmengen in den Proben der isolierten DRM-Banden aus den Dichtegradienten erfolgte mit dem Amplex-Cholesterol-Bestimmungs-Kit. Vor Verwendung wurde das mitgelieferte Amplex Red Reagent in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und der 5x Reaction Buffer mit Reinstwasser fünffach verdünnt. In diesem 1x Reaction Buffer wurden die Horseradish Peroxidase (HRP, 200 U/ml) und die Cholesterol Oxidase (aus *Streptomyces*, 200 U/ml) gelöst und der Cholesterol-Referenzstandard (S_{max} Endkonzentration: 0,01 µg/µl) verdünnt. Alle Lösungen wurden bei -20°C gelagert. Vor

Verwendung wurden die Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt. Je Probe wurden 10 µl Probe und 40 µl 1x Reaction Buffer in ein schwarzes 96er Well vorgelegt und es wurde eine Standardreihe sowie der Reaktions-Mix pipettiert (siehe **Tabelle 8** und **Tabelle 9**).

Tabelle 8: Standardreihe für Cholesterolbestimmung mit dem Amplex-Kit

	1x Reaction Buffer	Volumen an S_{\max} [0,01 µg/µl]	Volumen an 40% Saccharose in HBS	resultierende Cholesterolmenge [nmol]
S0	40 µl	0	10 µl	0
S1	32 µl	8 µl	10 µl	0,2069
S2	24 µl	16 µl	10 µl	0,4138
S3	16 µl	24 µl	10 µl	0,6206
S4	8 µl	32 µl	10 µl	0,8275
S5	0	40 µl	10 µl	1,0344

Tabelle 9: Reaktions-Mix für Cholesterolbestimmung mit dem Amplex-Kit

Für 100 Assays (mit Esterase):

Amplex	75 µl
HRP	50 µl
Cholesterol Oxidase	50 µl
Cholesterol Esterase	0 (oder 5 µl)
Reaction Buffer	4,825 ml (4,820 ml)

Zu jeder Probe wurden 50 µl des Reaktions-Mix gegeben und für 30 Minuten bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Im Plattenreader (Infinite M200, Tecan Deutschland GmbH) wurde bei 535 nm die Fluoreszenz angeregt und die Fluoreszenzemission bei 590 nm gemessen. Anhand der Standardkurve erfolgte die Berechnung der Cholesterolkonzentration in den Proben. Die untere Empfindlichkeitsgrenze dieses Kits wird mit 0,2 nmol angegeben. Unsere Werte in den Bandenproben lagen im Bereich von 0,5 bis 2 nmol.

Beide Cholesterolkits (beschrieben unter 3.10.2 und 3.10.3) wurden zuvor getestet und lieferten in den gemessenen Proben vergleichbare Cholesterolmengen.

3.11 Hochauflösende ^{31}P -NMR-Spektroskopie

Die Messungen wurden von Frau Dr. Beate Fuchs (Universität Leipzig, Institut für Medizinische Physik und Biophysik) durchgeführt. Die Lipidextrakte wurden in 50 mM Tris (pH 7,65) mit 200 mM Natriumcholat und 5 mM EDTA mit dem Vortex resuspendiert (nach

[62, 88]). Jeweils 0,5 ml Probe wurde in ein 5 mm NMR-Röhrchen überführt und der ^{31}P -Kern mit einem Bruker DRX-600 Spektrometer bei 242,88 MHz gemessen. Alle Messungen erfolgten mit einem selektiven ^{31}P -NMR-Probenkopf bei 37°C mit „composite pulse decoupling“ (Waltz-16), um die ^{31}P - ^1H -Kopplung zu eliminieren. Es wurden Pulsintervalle (D1) in der Größenordnung von T_1 verwendet, um eine quantitative Analyse der Phospholipide über die integralen Intensitäten zu ermöglichen [97]. Die weiteren NMR-Parameter sind in **Tabelle 10** zu finden. Als Referenzlipid für die Konzentration und Frequenz der Einzellipide wurde Phosphatidsäure (PA, 10 µg, entspricht 32,5 µmol/l) zu den Proben hinzugefügt. Die Spektren wurden mit der Software „1D WINNMR“ Version 6.2® (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten) ausgewertet, wobei die „Deconvolution (II) Routine“ für die Berechnung der Flächen unter den Peaks verwendet wurde.

Tabelle 10: Verwendete ^{31}P -NMR-Parameter

Acquisition time	1 s
Data size	8-16 k
Pulse	60°, 7 µs
Pulse delay	2 s
Line-broadening	1 Hz

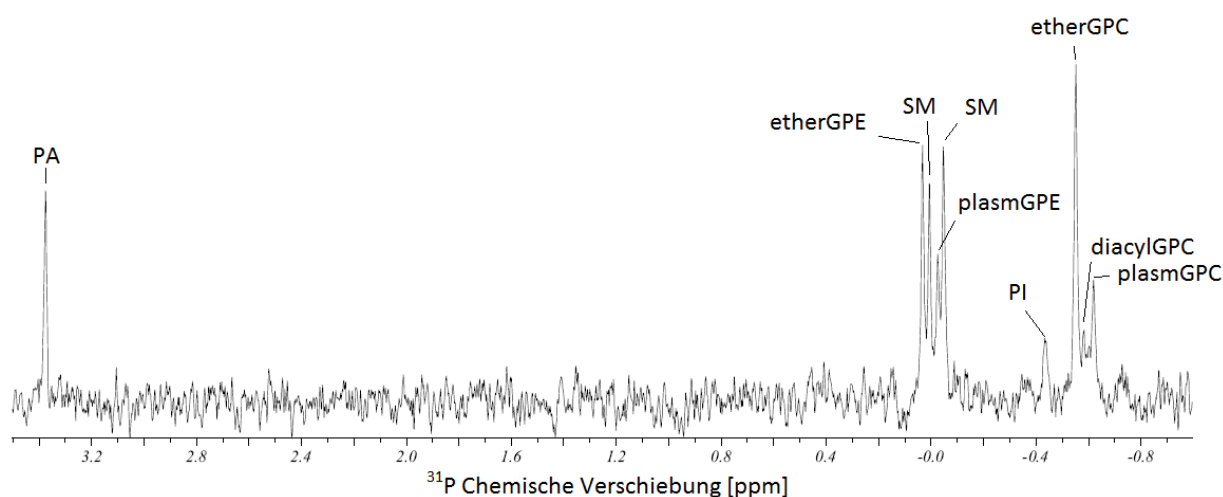


Abbildung 10: ^{31}P -NMR-Beispielspektrum für die Analyse von Phospholipiden in Spermienproben

3.12 Dünnschichtchromatographie

Die Trennungen wurden von Frau Dr. Beate Fuchs (Universität Leipzig, Institut für Medizinische Physik und Biophysik) durchgeführt. Die Lipidextrakte wurden in 25 µl Chloroform gelöst (mind. 1 nmol/µl) und kurz auf dem Vortex gemischt. 5 µl der Lipidlösung wurden automatisch mit dem Linomat V (CAMAG, Mutenz, Schweiz) auf die TLC-Platte auf einer zuvor markierten Bleistiftlinie aufgetragen und trockengeföhnt. Vom Lipidstandard (POPC, POPE, DPPG, LPC 18:0, DPPA, SOPC, SM 16:0, je 2,5 mg in 1600 µl Gesamtvolumen) wurden 2 µl aufgetragen. Die beladene Platte wurde in die mit 7 ml Laufmittel (Chloroform/Ethanol/Wasser/TEA, 30:35:7:35) befüllte Laufkammer gestellt. Die chromatographische Trennung erfolgte in der geschlossenen Laufkammer für 45-50 Minuten, bis die Laufmittelfront ca. 2 cm bis unter den Rand gelaufen war. Die trockengeföhnte Platte wurde mit Primulin besprüht und getrocknet. Unter der UV-Lampe wurden die Spots mit Bleistift markiert, um sie dann mit dem Skalpell abzukratzen und in kleine Glasröhrchen (in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen steckend) zu überführen. Für die Lipidextraktion (Elution) wurden 0,9%ige NaCl-Lösung, Methanol und Chloroform im Verhältnis 1:1:1 zugegeben und für 15 Sekunden auf dem Vortex gemischt. Mittels Zentrifugation (2500 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur) wurden die Phasen getrennt und die untere Phase (Chloroformphase) in ein neues Glasröhrchen mittels Mikroliterspritze (Hamilton Bonaduz AG, Schweiz) überführt. Die obere Phase wurde ebenfalls vorsichtig (ohne das Kieselgel) entfernt und verworfen. Die Extraktion wurde insgesamt dreimal wiederholt und die organischen Phasen vereinigt. Das Chloroform wurde unter Stickstoff bei 40°C abgedampft. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

3.13 MALDI-TOF MS

Die Messungen wurden von Frau Dr. Beate Fuchs und Frau Dr. Ariane Nimptsch (Universität Leipzig, Institut für Medizinische Physik und Biophysik) durchgeführt. Alle MS Messungen und damit die Aufnahme von Positiv- und Negativspektren erfolgten an einem Autoflex MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland), ausgestattet mit einem gepulsten 337 nm Stickstofflaser und mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV. Um eine Sättigung des Detektors mit Matrixionen zu vermeiden (insbesondere $m/z < 400$) erfolgten die Messungen mit Matrixunterdrückung, wobei als Matrices 2,5-

Dihydroxybenzoesäure (DHB) und 9-Aminoacridin (9-AA) verwendet wurden. Die Lipidextrakte wurden 1:1 (v/v) mit 0,5 mol/l DHB in Methanol oder 10 mg/ml 9-AA in Isopropanol/Acetonitril (3:2) gemischt und auf ein goldbeschichtetes MALDI-Target aufgetragen. Für jedes Massenspektrum wurden 100 Lasershots gemittelt. Zur Verbesserung der Auflösung wurden die Spektren im Reflektormodus unter sogenannter „delayed extraction“ aufgenommen, um die Unterschiede in den Initialgeschwindigkeiten der Ionen zu verringern [26]. Die anschließende Datenverarbeitung erfolgte mittels der Software „Flex Analysis“, Version 2.2 (Bruker, Deutschland).

3.14 Proteinbestimmung nach Smith [108]

Je 20 µl der Standardproteinreihe (mit 0,1, 0,2 ... 1,0 und 1,0, 2,0 ... 10,0 mg/ml BSA, in Doppelbestimmung) und jeweils 20 µl je Probe wurden in eine 96er Platte pipettiert. Die hochkonzentrierten Proben (gewaschene Spermien, Überstände) wurden zuvor mit PBS 1:10 verdünnt. PBS diene außerdem als Blindprobe. Es wurden 29,4 ml Reagenz A (1% BCA- Na_2 , 2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, 0,16% Natriumtartrat-Dihydrat, 0,4% NaOH, 0,5% NaHCO_3 , pH 11,25, bei 4°C lagern) und 600 µl Reagenz B (4% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$) gemischt und je 300 µl zu jedem Standard und jeder Probe gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Absorption bei 492 nm gemessen (Plattenreader Infinite M200, Tecan Deutschland GmbH) und die Proteinkonzentration anhand der Standardreihe berechnet.

3.15 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Da auch Proteine ein wichtiger Bestandteil von Membrandomänen sind, sollte mittels der SDS-PAGE überprüft werden, ob sich auch die Proteinzusammensetzung der DRMs in den Spermien in Abhängigkeit vom Reifungsgrad der Spermien bzw. durch den Kontakt zu Seminalplasma ändert. Auch die Proteinzusammensetzung der DRMs von Spermien unterschiedlicher Kälteresistenz wurde analysiert. Da der Fokus auf Proteinen mit kleinen Molekulargewichten lag, wurden 20%ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Außerdem wurden überwiegend 1,5 mm dicke Gele erstellt, um möglichst viel der gering konzentrierten Proben aufragen zu können. Zuerst wurde ein Trenngel gegossen, das nach dem Erstarren mit

einem Sammelgel überschichtet wurde. Die Zusammensetzung der Gele ist in **Tabelle 11** zu finden.

Tabelle 11: Zusammensetzung der 20%igen SDS-Gele

Trenngel:		Sammelgel:	
2,34 ml	H ₂ O	1,827 ml	H ₂ O
2,5 ml	Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	0,75 ml	Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)
50 µl	20% SDS	15 µl	20% SDS
5 ml	40% Gellösung (37,5 : 1 = Acrylamid : Bisacrylamid)	375 µl	40% Gellösung (37,5 : 1 = Acrylamid : Bisacrylamid)
15 µl	TEMED	6 µl	TEMED
120 µl	10% APS	50 µl	10% APS

Es wurden jeweils 30 µl (ggf. mit PBS verdünnte) Probe mit 10 µl Probenpuffer (200 mM Tris-Cl pH 6,8, 4% SDS, 0,5 M DTT, 50% Glycerol und 0,04% Bromphenolblau) versetzt und davon etwa 35 µl in die Geltaschen pipettiert. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Als Proteinstandard wurde die „Prestained Protein Ladder“ verwendet, von der jeweils 5 µl aufgetragen wurden. Es wurde ein SDS-Laufpuffer (25 mM Tris Base, 192 mM Glyzin, 0,1% SDS) verwendet. Nach 30 Minuten bei 70 V wurde die Spannung am Gel für 60 bis 90 Minuten auf 120 V erhöht, bis sich die blaue Front des Probenpuffers am unteren Ende des Gels befand. Die Gele wurden mit der sensitiven Coomassie-Blue-Färbung gefärbt. Dazu wurde das Gel nach zweimaligem Waschen für 10 Minuten mit Reinstwasser für drei Stunden unter Schütteln in die Färbelösung [0,02% Coomassie Blue (CBB G-250), 5% Aluminiumsulfat-16-Hydrat, 10% Ethanol (>96%) und 2% ortho-Phosphorsäure in Reinstwasser] gelegt. Nach zweimaligem Abspülen mit Reinstwasser kam das Gel für 20 Minuten in den Entfärber [10% Ethanol (>96%) und 2% ortho-Phosphorsäure in Reinstwasser]. Abschließend wurde das Gel zweimal 10 Minuten in Reinstwasser gewaschen und für die Dokumentation eingescannt.

3.16 Proteinidentifizierung mittels Trypsinverdau und anschließender MALDI-TOF MS Analyse

Die Messungen wurden von Frau Dr. Ariane Nimptsch (Universität Leipzig, Institut für Medizinische Physik und Biophysik) durchgeführt. Für den Verdau wurde Trypsin Gold (Promega, Artikelnummer V5280) verwendet. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine im Polyacrylamidgel wurden die Gele mit der Färbelösung SimplyBlueTMSafeStain (Invitrogen, Artikelnummer LC6060) gefärbt und in Reinstwasser entfärbt. Die Banden wurden mit einem gereinigten Skalpell ausgeschnitten. Anschließend erfolgte eine zweimalige Entfärbung der Gelstückchen in 100 mM NH_4HCO_3 /50% Acetonitril für 45 Minuten bei 37°C. Nach einer Entwässerung der Gelstückchen in 100 μl 100%igem Acetonitril für 5 Minuten bei Raumtemperatur, wurden sie für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, um restliches Acetonitril zu entfernen.

Das Trypsin Gold wurde in 50 mM Essigsäure mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gelöst und mit 40 mM NH_4HCO_3 /10% Acetonitril auf 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ weiter verdünnt. In 20 μl dieser Trypsin-Lösung wurden die Gelstückchen bei Raumtemperatur für eine Stunde vorinkubiert, um die Gelstückchen zu rehydrieren. Weiterer Verdau puffer (40 mM NH_4HCO_3 /10% Acetonitril) wurde bis zur Bedeckung der Gelstückchen zugefügt und bei 37°C im geschlossenen 1,5 ml Reaktionsgefäß über Nacht inkubiert. Nach diesem Verdau wurden die Proteine mit einer wässrigen und einer organischen Lösung aus dem Gel extrahiert: Dazu wurden zuerst 150 μl Reinstwasser zugefügt und nach 10 minütigem Mischen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die organische Extraktion wurden zweimal 50 μl 50%iges Acetonitril/5%ige Trifluoressigsäure zugefügt und jeweils 60 Minuten bei 500 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden alle drei Extrakte vereinigt und mit einer Vakuumzentrifuge bei Raumtemperatur für zwei bis vier Stunden getrocknet. Die eingedampften Peptide wurden mit 10 μl 0,1 % TFA resuspendiert und nach Herstellerangaben mittels ZipTips (Millipore, Artikelnummer ZTC18S008) gereinigt. Am Ende dieser Prozedur wurden die Peptide mit 2,5 μl Matrixlösung (10 mg/ml alpha-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure, HCCA) in 70% Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure vom C18-Material der ZipTips eluiert und direkt auf ein goldbeschichtetes MALDI-Target aufgetragen. Die Zimtsäure dient dabei als Matrix der MALDI-TOF-MS Analyse (siehe 3.13) der Peptide.

Mittels einer Datenbanksuche (Datenbank Mascot, bezieht Daten aus der NCBI-Datenbank und von Swissprot mit ein) wurden die gemessenen Peptidmassen den Ursprungsproteinen zugeordnet.

3.17 Statistische Analyse der Daten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm PASW Statistics 18 (Version 18.0.0). Dabei wurden für die Vergleiche der Lipidmengen in den Nebenhoden- und Ejakulatspermienproben der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben und für die Vergleiche der Lipidmengen in den gewaschenen Spermien und dem Überstand der Ejakulatspermien ein gepaarter T-Test verwendet (4.2.2). Für die Vergleiche der NMR-Untersuchungen von Nebenhoden- und Ejakulatspermien wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben getestet (4.2.3). Bei den Untersuchungen von 64 Ebern auf die Kälteempfindlichkeit ihrer Spermien fand der Wilcoxon-Test Verwendung (4.5.1). Der Vergleich der verschiedenen Eber hinsichtlich der Kälteempfindlichkeit ihrer Spermien mit wiederholten Messungen verschiedener Ejakulate der gleichen Eber wurde mit dem Wilcoxon-Test (exakt) überprüft (4.5.2).

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse zur Präparation detergentenzresistenter Membrandomänen mit verschiedenen Detergenzien dargestellt. Anschließend folgen die Ergebnisse der Analyse von DRMs aus Spermien verschiedener Entwicklungsstufen, aus Seminalplasma und aus Nebenhodenspermien, die mit Seminalplasma inkubiert wurden. Im letzten Teil des Kapitels werden die Untersuchungsergebnisse der Kältetoleranz von Eberspermien beschrieben, um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Kältetoleranz und der Zusammensetzung der DRMs gibt.

4.1 Präparation detergentenzresistenter Membrandomänen mit unterschiedlichen Detergenzien

Die Ergebnisse zur Präparation von detergentenzresistenten Membrandomänen (DRMs) aus Eberspermien mit verschiedenen Detergenzien wurden teilweise bereits veröffentlicht [43]. In Gesamtspermien ließen sich pro 1 Million Ejakulatspermien 0,5 nmol Cholesterol, 1,3 nmol Phospholipide finden ($n = 2$). Daraus ergibt sich ein C/P-Wert von 0,37.

Tabelle 12: Relative Lipid- und Proteinmengen der Eberspermien, die nach Detergenzbehandlung und mechanischem Aufschluss in den Überständen und nach der Ultrazentrifugation in den DRM-Banden sowie der Bodenfraktion gemessen wurden. Lipidmengen in den Gesamtspermien (pro 1 Mio Spermien): Cholesterol = 0,5 nmol, Phospholipid = 1,3 nmol, C/P-Wert = 0,37

Detergenz	Anteil im Überstand			Bodenfraktion des Dichtegradienten			Bandenfraktionen des Dichtegradienten (ggf. Bande1/Bande2)		
	Cholesterol [%]	Phospholipid [%]	Protein [mg/10 ⁹ Spermien] ²⁾	Cholesterol [%]	Phospholipid [%]	Protein [%]	Cholesterol [%]	Phospholipid [%]	Protein [%]
	- bezogen auf Gesamtspermien ¹⁾ -			- bezogen auf den Überstand ³⁾ -			- bezogen auf den Überstand ³⁾ -		
ohne	0,0	5,2	0,49	0,0	1,7	34,6	0,0	49	13,7
Triton X-100	50,4	68,9	2,28	8,0	8,4	18,3	11,4/10,5	9,8/7,9	0,0/4,7
Brij 98	11,6	12,9	1,57	5,4	7,0	24,6	19,3/33,2	9,0/18,7	0,0/0,8
Pluronic F-127	0,0	2,3	0,68	0,0	1,9	13,7	0,0	10,2	0,0
Thesit	40,4	39,8	2,27	14,3	12,0	28,6	4,1/4,9	2,1/2,2	0,3/1,3
Natriumcholat	79,8	79,0	3,07	4,5	5,4	20,0	36,4	68,6	29,3
CHAPS	88,5	85,7	2,57	10,0	20,0	24,6	0,8/11,3	1,0/19,0	0,0/21,0
Tween 20	0,0	9,1	2,01	0,0	4,2	15,9	0,0	38,3	5,8
Brij 96V	61,5	61,7	2,27	3,3	2,6	20,8	1,7	2,5	3,8
Brij 58P	17,1	17,5	1,54	7,9	9,7	25,8	3,6/16,0	3,1/9,1	1,0/0,5

- 1) Die prozentualen Werte der Überstände beziehen sich auf den Gesamtlipidgehalt (also Gesamtcholesterolgehalt bzw. Gesamtphospholipidgehalt) in der Summe aus Überstand und Pellet.
- 2) Der Proteingehalt im Überstand wurde auf 1 Milliarde Spermien berechnet.
- 3) Die prozentualen Werte der Banden- und Bodenfraktion beziehen sich auf den Cholesterol-, Phospholipid- und Proteingehalt des aufgetragenen Überstandes

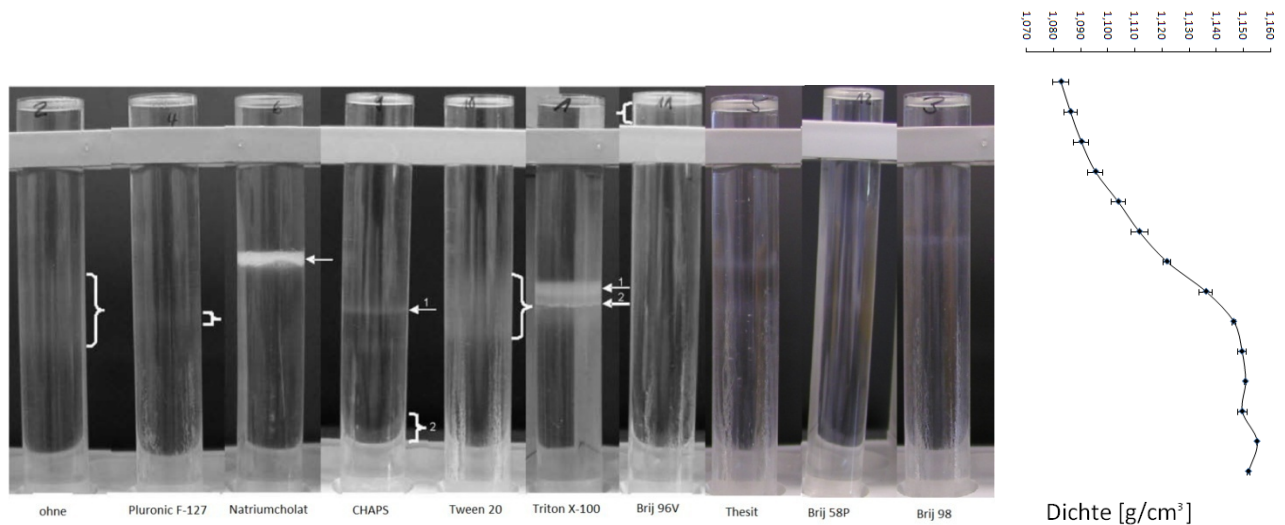


Abbildung 11: Dichtegradienten der DRM-Präparationen aus Eberspermien mit unterschiedlichen Detergenzien und ohne Detergenz nach der Ultrazentrifugation. Die verschiedenen Detergenzien produzierten mehr oder weniger stark ausgeprägte Bandenmuster. Deutlich Banden im mittleren Dichtebereich lassen sich vor allem beim Natriumcholat und Triton-X 100 finden. Im rechten Bildrand sind die Dichten im jeweiligen Bereich des Gradienten dargestellt.

Auch bei den Gradienten in Abbildung 11 sieht man, dass die verschiedenen Detergenzien unterschiedliche Ergebnisse produzierten: Scharfe abgetrennte, deutliche Banden ließen sich nur bei Natriumcholat und Triton X-100 finden. Beim Natriumcholat war eine starke Bande bei einer Dichte von etwa 1,112 bis 1,117 g / cm³ sichtbar. Beim Triton X-100 gab es zwei Banden bei einer Dichte von etwa 1,127-1,138 g / cm³, wobei die obere Bande breiter war als die untere. Beim CHAPS waren nur zwei schwächere Bande zu sehen, die obere bei einer ungefähren Dichte von 1,14 g / cm³ und die untere (die wegen des Reagenzglasständers schlecht sichtbar ist) bei einer Dichte von etwa 1,15 g / cm³. Bei der Präparation ohne Detergenz und beim Pluronic F-127 ist jeweils nur eine sehr schwache Trübung sichtbar. Die Trübung beim Tween 20 ist ebenfalls recht schwach und zudem über einen relativ großen Dichtebereich von etwa 1,125 bis 1,145 g / cm³ verteilt. Der Gradient von Brij 96V liefert eine trübe Bande bei der geringsten Dichte (< 1,085 g / cm³). Thesit, Brij 58P und Brij 98 erzeugen Gradienten mit jeweils zwei nur sehr schwach sichtbaren Banden, die sich etwa in den mittleren Dichtebereichen des Gradienten befinden.

In den Banden, die aus den Gradienten isoliert wurden, fand sich nur beim Triton X-100, CHAPS und Natriumcholat eine für die Analytik ausreichende Menge an Lipid und Protein (siehe **Tabelle 12**). Beim Triton X-100 wurde in beiden Banden geringfügig mehr Cholesterol als Phospholipid gefunden. Bei wiederholten Untersuchungen verschiedener Ejakulate (n = 3)

ließen sich beim Triton in beiden Banden insgesamt $28,3\% \pm 9,0\%$ des Gesamtcholesterols und $19,4\% \pm 2,3\%$ des gesamten Phospholipids finden. In der Bodenfraktion dieser Proben befanden sich $11,1\% \pm 4,3\%$ des Gesamtcholesterols und $9,2\% \pm 1,2\%$ des gesamten Phospholipids. Beim CHAPS befand sich der überwiegende Teil der Lipide und des Proteins in der Bande oberhalb der Bodenfraktion. Beim Natriumcholat und beim CHAPS ließ sich deutlich mehr Protein in den Banden finden als beim Triton, bei dem sich nur in der 2. Bande eine messbare Proteinmenge befand. Messungen der restlichen Fraktionen der Gradienten ohne sichtbare Trübungen zeigten, dass sich auch in diesen messbares Lipid und Protein befand.

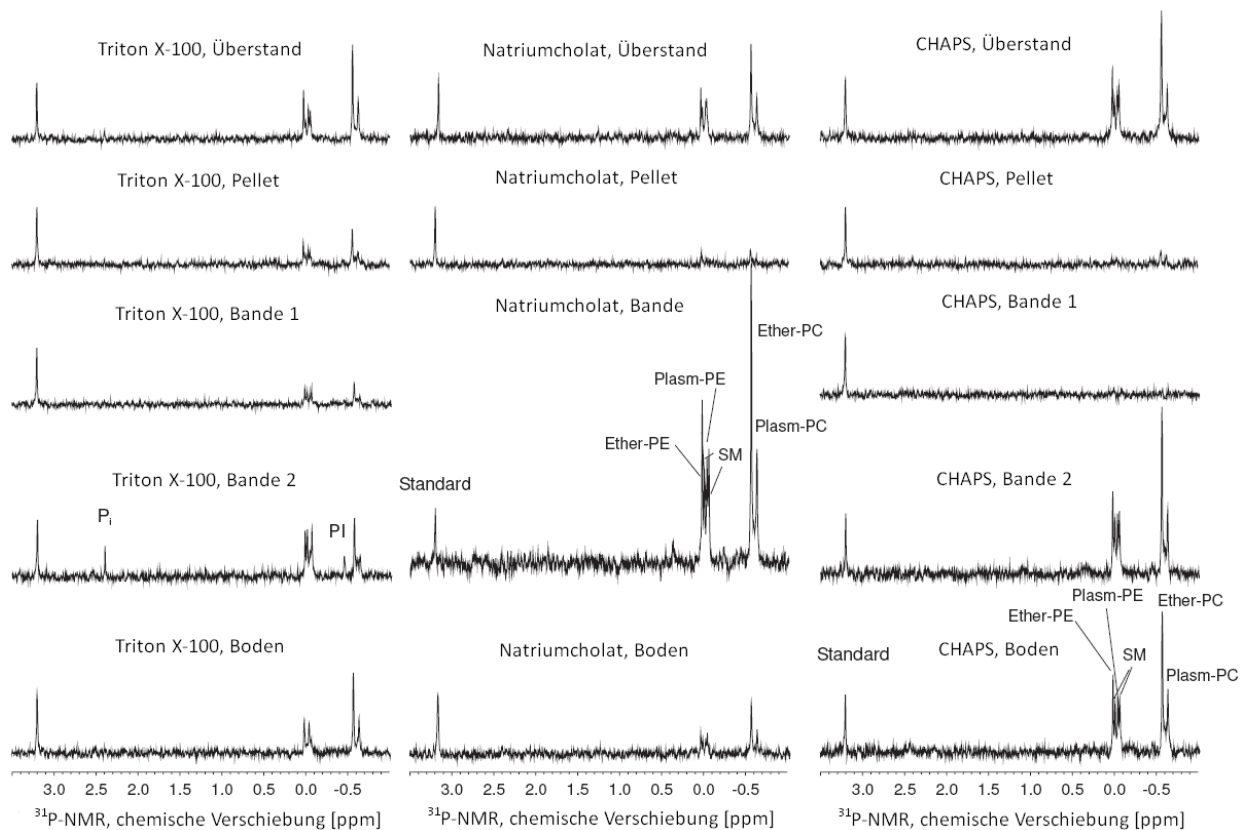


Abbildung 12: ^{31}P -NMR-Spektren der Kontrollproben (Überstand und Pellet) sowie der Gradientenproben (DRM-Banden und Bodenfraktion) der Detergenzien Triton X-100, Natriumcholat und CHAPS. Die Spektren wurden auf den zugesetzten internen Standard ($32,5 \mu\text{mol/l}$ Phosphatidsäure) skaliert. Ein Vergleichsspektrum von Spermien ohne Detergenz lässt sich in Abbildung 10 finden.

Mittels der ^{31}P -NMR konnten die unterschiedlichen Lipidklassen der Proben analysiert werden. Anhand der Flächen unter den Peaks ließen sich für die einzelnen Lipidklassen auch ihre quantitativen Anteile in den Proben berechnen. **Abbildung 12** zeigt die ^{31}P -NMR-Spektren der Gradienten- und Kontrollproben der Detergenzien Triton X-100, Natriumcholat und CHAPS. Die Bandenproben der anderen Detergenzien waren zu gering konzentriert, um

auswertbare Spektren zu liefern. Um die Spektren besser vergleichbar zu machen, wurden sie alle auf gleiche Höhe des internen Standards (Phosphatidsäure, 32,5 µmol / l) skaliert. In **Tabelle 13** ist die quantitative Auswertung der NMR-Spektren dargestellt. Gezeigt sind die Anteile der verschiedenen Phospholipidklassen am Gesamtlipid. Die Peaks der diacylGPCs wurden bei der quantitativen Auswertung (außer bei den Gesamtspermien, diacylGPC/GesamtGPC = 17%) nicht berücksichtigt und sind nach optischer Auswertung der Spektren nur in Spuren vorhanden.

In den Spektren der Bande 1 von CHAPS konnten keine Phospholipide detektiert werden, sie zeigte auch bei den biochemischen Lipidbestimmungen die geringsten Lipidmengen (**Tabelle 12**, Bande 1). Hingegen wurden in der Bande 2 vom CHAPS und in den Banden der anderen beiden Detergenzien Phospholipide detektiert. Allerdings variierten die individuellen Verhältnisse der verschiedenen Phospholipidklassen stark zwischen den Proben. Nur für Triton X-100, insbesondere für Bande 2, ließ sich Phosphatidylinositol und eine Anreicherung an Sphingomyelin und Phosphatidylethanolamin im Vergleich zu den Phosphatidylcholinen finden. Das Verhältnis von Etherlipiden zu Plasmalogenen veränderte sich zwischen den einzelnen Proben kaum, sowohl für die Phosphatidylcholine als auch die Phosphoethanolamine war zumeist doppelt so viel Etherlipid wie Plasmalogen vorhanden.

Eine genaue Analyse der spezifischen Lipide mittels MALDI-TOF MS erfolgte nicht, da die Spektren, wie in der Einleitung beschrieben (2.6), durch die in den Proben vorhandenen Detergenzien stark gestört wurden, was insbesondere für die ionischen Detergenzien wie z. B. CHAPS gilt.

Tabelle 13: Mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie bestimmte Anteile der verschiedenen Phospholipidklassen in den Gesamtspermien, Überständen, Pellets, DRM-Banden und Bodenfraktionen. Prozentuale Werte sind auf das Gesamtlipid (GPE %, SM %, GPC %, PI %) bzw. auf GesamtGPC (etherGPC, plasmGPC) oder GesamtGPE (etherGPE, plasmGPE) in den verschiedenen Probenfraktionen bezogen. (Ü = Überstand und P = Pellet nach Detergenzbehandlung und mechanischem Aufschluss; Banden und Boden: Fraktionen der Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation)

Probe	GPE [%]	SM [%]	GPC [%]	PI [%]	etherGPC [%]	plasmGPC [%]	etherGPE [%]	plasmGPE [%]
Gesamtspermien ¹⁾	25	20	54	-	52 ²⁾	30 ²⁾	60	40
Triton Ü	25	18	57	-	70	30	63	37
Triton P	21	27	53	-	62	38	76	24
Triton Bande 1	25	31	44	Spuren	73	27	65	35
Triton Bande 2	25	29	37	9	74	26	56	44
Triton Boden	28	14	58	-	61	39	52	48
NaCholat Ü	17	29	54	-	63	37	70	30
NaCholat P	33	Spuren	67	-	75	25	Spuren	Spuren
NaCholat Bande	27	19	54	Spuren	78	22	58	42
NaCholat Boden	20	22	59	-	66	34	70	30
CHAPS Ü	26	21	53	-	67	33	64	36
CHAPS P	Spuren	Spuren	100	-	65	35	Spuren	Spuren
CHAPS Bande 1	Spuren	Spuren	Spuren	-	-	-	Spuren	Spuren
CHAPS Bande 2	Spuren	Spuren	Spuren	-	-	-	Spuren	Spuren
CHAPS Boden	23	24	53	Spuren	67	33	60	40

1) Die ^{31}P -NMR-Werte der Gesamtspermien (n = 8) entstammen späteren Versuchen, da zum Zeitpunkt der ^{31}P -NMR-Analysen der verschiedenen Detergenzienproben keine Gesamtspermien analysiert wurden.

2) In den Gesamtspermien ließ sich zusätzlich ein Anteil von 17% diacylGPC finden.

4.2 Analyse präparierter detergentenresistenter Membrandomänen (DRMs) aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien von Ebern

Die Motilität der eingesetzten Nebenhodenspermien betrug 5-10% für Spermien aus dem Caput, 40% für Spermien aus dem Corpus und 50-70% für Spermien aus der Cauda. Die eingesetzten Ejakulatspermien hatten Motilitäten >80%.

4.2.1 Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation

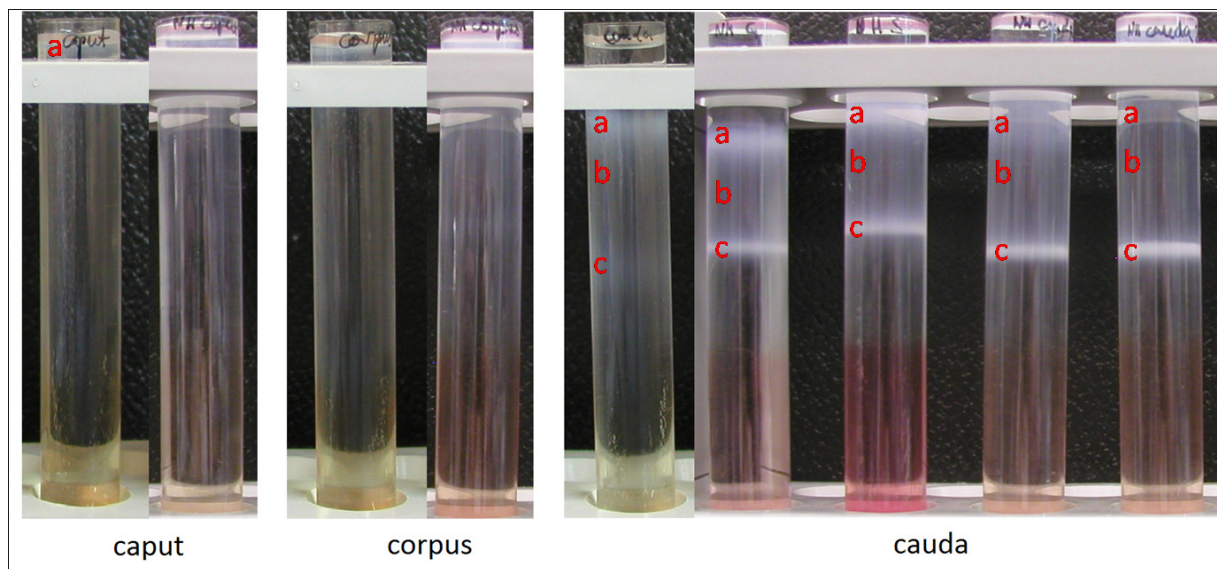
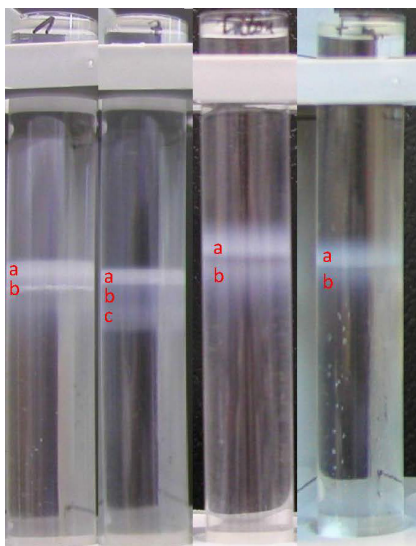


Abbildung 13: Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation von DRM-Präparationen (Triton X-100) mit Nebenhodenspermien aus den verschiedenen Regionen des Nebenhodens (caput, corpus, cauda). Bei den Proben aus dem Caput und dem Corpus lassen sich nur im obersten Gradientenbereich ganz schwache Banden finden. Bei den Proben aus der Cauda sind zwei deutlich Banden (a und c,) im mittleren Dichtebereich ($1,09$ bis $1,12 \text{ g / cm}^3$) sichtbar, der Bereich zwischen diesen Banden (b) zeigt ebenfalls eine leichte Opaleszenz.



Ejakulatspermien

Abbildung 14: Verschiedene Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation von DRM-Präparationen mit Triton X-100 aus Ejakulatspermien des Ebers. Weitere Gradienten lassen sich in Kapitel 4.5.3.1 in **Abbildung 30** finden. In den Gradienten sind mehrer opaleszente Banden im mittleren Dichtebereich ($1,120\text{-}1,135\text{ g / cm}^3$) sichtbar.

In **Abbildung 13** und **Abbildung 14** sind Fotos der Dichtegradienten von DRM-Präparationen aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien zu sehen. Bei den Spermien aus Caput und Corpus ließen sich nur im obersten Gradientenbereich, also bei einer Dichte von etwa $1,08\text{ g / cm}^3$, sehr schwache Banden finden. Bei den Spermien der Cauda traten zwei Banden auf, die etwa in einem Dichtebereich von $1,09$ bis $1,12\text{ g / cm}^3$ lagen, wobei der Bereich zwischen diesen beiden Banden auch eine sehr schwache Trübung zeigte.

Bei den Dichtegradienten der Ejakulatspermien (**Abbildung 14** und **Abbildung 30**) ließen sich zumeist zwei oder drei trübe Banden im mittleren Dichtebereich ($1,120\text{-}1,135\text{ g / cm}^3$) finden. Das Bandenmuster variierte zwar zumeist etwas zwischen den einzelnen Proben, unterschied sich aber deutlich von den Gradienten der Nebenhodenspermien.

4.2.2 Lipid- und Proteinmengen in gewaschenen Spermien und DRMs aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien

Sowohl der Cholesterol- als auch der Phospholipidgehalt schienen sich im Verlauf der Reifung in den Spermien etwas zu verringern (**Tabelle 14**). Nach der Ejakulation nahm vor allem der Cholesterolgehalt wieder zu, sodass der C/P-Wert wieder stieg. Der Proteingehalt in den Spermien folgte diesem Trend. Das Verhältnis von Lipid-/Proteingehalt nahm ebenfalls

im Laufe der Reifung ab und sank auch nach der Ejakulation weiter. Diese Unterschiede waren jedoch alle nicht signifikant (Vergleich der Nebenhodenspermien aus der Cauda mit den Ejakulatspermien, Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben).

Tabelle 14: Lipid- und Proteinmengen sowie Cholesterol zu Phospholipid- und Gesamtlipid zu Proteinverhältnisse in Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Spermien aus (n)	CHO pro 1 Mio Spermien [nmol]	PL pro 1 Mio Spermien [nmol]	CHO/PL [nmol/nmol]	Protein pro 1 Mio Spermien [μ g]	Lipid/Protein [nmol/ μ g]
Nebenhoden, caput (2)	2,29/3,17	5,28/17,74	0,43/0,18	19,7/46,0	0,38/0,45
Nebenhoden, corpus (2)	1,11/0,71	3,10/4,62	0,36/0,15	24,7/17,0	0,17/0,31
Nebenhoden, cauda (5)	0,69 \pm 0,17	2,48 \pm 0,93	0,31 \pm 0,10	14 \pm 5	0,24 \pm 0,03
Ejakulat (12)	0,92 \pm 0,33	2,62 \pm 1,02	0,38 \pm 0,12	19 \pm 7	0,19 \pm 0,06

Die C/P-Werte der Überstände aus den Spermien verschiedener Reifestadien (**Tabelle 15**) veränderten sich im Rahmen der Standardabweichung nicht, ebenso konnten im Rahmen der Messgenauigkeit keine Unterschiede beim Lipid-/Proteinverhältnis festgestellt werden.

Tabelle 15: Cholesterol zu Phospholipid- und Gesamtlipid zu Proteinverhältnisse in den Überständen für die DRM-Präparation aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Spermien aus (n)	CHO/PL [nmol/nmol]	Gesamtlipid/Protein [nmol/ μ g]
Nebenhoden, caput (2)	0,41/0,25	0,36/0,50
Nebenhoden, corpus (2)	0,36/0,29	0,23/0,64
Nebenhoden, cauda (5)	0,33 \pm 0,10	0,61 \pm 0,25
Ejakulat (12)	0,28 \pm 0,05	0,52 \pm 0,16

Der C/P-Wert in den Überständen der Ejakulatspermien war jedoch signifikant geringer als in den gewaschenen, unbehandelten Ejakulatspermien (gepaarter t-Test, n = 12, p < 0,03), d. h. es befand sich im Verhältnis zu Phospholipid weniger Cholesterol in den abgelösten Spermienmembranen als bei den gesamten Spermien.

Tabelle 16: Cholesterol zu Phospholipid- und Gesamtlipid zu Proteinverhältnisse in den Banden der DRM-Präparationen aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (Mittelwert \pm Standardabweichung), ^a bzw. ^b: signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Banden der Nebenhoden- und der Ejakulatspermien (Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 6$, $p < 0,04$)

Spermien aus (n)	Bande a		Bande b		Bande c	
	CHO/PL [nmol/nmol]	Gesamtlipid/ Protein [nmol/ μ g]	CHO/PL [nmol/nmol]	Gesamtlipid/ Protein [nmol/ μ g]	CHO/PL [nmol/nmol]	Gesamtlipid/ Protein [nmol/ μ g]
Nebenhoden, caput (1)	0,25	5,81	-Keine Bande-		-Keine Bande-	
Nebenhoden, cauda (6)	$0,23 \pm 0,09^a$	$5,25 \pm 1,94^a$	$0,28 \pm 0,05$	$7,06 \pm 4,29^a$	$0,28 \pm 0,09$	$4,96 \pm 2,66^a$
Ejakulat (8)	$0,38 \pm 0,16^b$	$3,07 \pm 0,91^b$	$0,34 \pm 0,12$	$2,44 \pm 0,44^b$	$0,36 \pm 0,08$	$1,87 \pm 0,47^b$

Bei den isolierten Banden der Dichtegradienten (**Tabelle 16** und **Tabelle 17**) nahm der Cholesterolgehalt gegenüber dem Phospholipidgehalt nach Kontakt mit dem Seminalplasma bei der Ejakulation zu, sodass der C/P-Wert in allen Banden stieg. Dieser Unterschied war für die Bande a signifikant (Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 6$, $p < 0,03$). Das Verhältnis von Lipid/Protein verhielt sich gegenläufig dazu und verringerte sich signifikant nach der Ejakulation in allen Banden (Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 6$, $p < 0,04$).

Tabelle 17: Relative Lipidmengen in den Überständen und Banden, die Anteile in den Überständen beziehen sich auf den Gesamtlipidgehalt der Spermien, die Anteile in den Banden beziehen sich auf den Lipidgehalt des eingesetzten Überstandes

Probe (n)	Überstand		Bande a		Bande b		Bande c	
	CHO [%]	PL [%]	CHO [%]	PL [%]	CHO [%]	PL [%]	CHO [%]	PL [%]
	-bezogen auf Gesamtspermien-		-bezogen auf den eingesetzten Überstand-					
Spermien NH, cauda (5)	77 ± 14	79 ± 7	11 ± 3	15 ± 3	10 ± 3	10 ± 1	6 ± 3	7 ± 3
					Summe aller Banden:		26	32
Ejakulatspermien (5)	78 ± 19	80 ± 7	12 ± 3	14 ± 4	10 ± 4	13 ± 5	9 ± 2	10 ± 4
					Summe aller Banden:		31	37

Im Überstand konnten etwa 80% des Cholesterols und 80% der Phospholipide des Gesamtlipidgehalts der Ejakulat- und auch der Nebenhodenspermien zurückerhalten werden (**Tabelle 17**). In den einzelnen isolierten Banden befanden sich jeweils 6 bis 12% des eingesetzten Cholesterols und 7 bis 15% des eingesetzten Phospholipids. In der Summe aller Banden wurde bei den Ejakulatspermien etwas mehr Lipid isoliert (31% Cholesterol und 37% Phospholipid) als bei den Nebenhodenspermien der Cauda (26% Cholesterol und 32% Phospholipid).

4.2.3 Analyse der Lipidklassen in DRMs aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien mittels ^{31}P -NMR

Ein Beispielspektrum der ^{31}P -NMR Analyse lässt sich im Methodenkapitel 3.11. (**Abbildung 10**) finden. Wie dort ersichtlich, lassen sich mit dieser Methode die einzelnen Lipidklassen in den Proben bestimmen. Aus den erhaltenen Spektren der ^{31}P -NMR Analysen konnten anhand des internen Standards (PA) die Anteile der einzelnen Lipidklassen in den Proben berechnet werden. Es wurde in allen Proben aus dem Nebenhoden kein PI detektiert. Bei den Ejakulatspermien wurde in den Banden der Dichtegradienten 1-5% PI gefunden. In den folgenden Tabellen sind die Anteile der Lipidklassen (GPE, SM, GPC) bezogen auf den Gesamtlipidgehalt dargestellt. Für die GPCs und die GPEs wurden auch die Anteile getrennt nach den Bindungen der Fettsäuren (Diacylbindung, Etherbindung, Plasmalogene) berechnet. Trotz der geringen Probenanzahl wurde eine statistische Auswertung durchgeführt, da es sich bei den drei Proben der Nebenhodenspermien der Cauda um einen Pool aus den Hodenpaaren von insgesamt sieben Ebern handelte. Um zu testen, ob es signifikante Unterschiede zwischen den Ejakulat- und Nebenhodenspermien aus der Cauda gab, wurde der Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben verwendet, $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet. Bei den *kursiv* geschriebenen Zahlen der Tabellen handelt es sich um recht unsichere Werte. Bei diesen Messungen lag schon ein sehr geringer Anteil an GesamtGPE vor, sodass ein Anteil der jeweils anderen GPEs (etherGPE oder plasmGPE) möglicherweise zu gering war, um im Spektrum sicher detektiert zu werden.

In **Tabelle 18** bis **Tabelle 22** lassen sich Veränderungen der Lipidzusammensetzung während der Reifung und nach der Ejakulation feststellen. Allgemein lässt sich sagen, dass teilweise Peaks in den Spektren auftauchten, die sich nicht bestimmten Lipiden zuordnen ließen (bei chemischen Verschiebungen von etwa -0,12 und -0,54 ppm). Dies führte dazu, dass bei den in den Tabellen angegeben %-Angaben teilweise einige Prozentpunkte zu vollen 100% fehlten. Bei den Nebenhodenspermienproben traten zudem in einigen Proben Lysolipide auf: So ließen sich in den gewaschenen Spermien aus der Cauda $12\% \pm 4\%$ Lysolipide finden, in den Überständen dieser Proben sogar $15\% \pm 9\%$ Lysolipide. In den beiden Proben aus den gewaschenen Spermien aus dem Caput und dem Corpus des Nebenhodens befanden sich jeweils 7% Lysolipide.

Tabelle 18: Anteile der verschiedene Lipidklassen am Gesamtlipidgehalt aus gewaschenen Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien sowie den Überständen der Detergenzbehandlung (alle Angaben in %), ^a bzw. ^b: signifikanter Unterschied zwischen den Nebenhodenspermien der Cauda und Ejakulatspermien (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 3$, $p < 0,015$)

Spermien aus (n)	Gesamtspermien			Überstand		
	GPE	SM	GPC	GPE	SM	GPC
Nebenhoden, caput (1)	0	37	42	4	34	55
Nebenhoden, corpus (1)	0	30	49	0	39	57
Nebenhoden, cauda (3)	5 ± 2^a	24 ± 4	50 ± 15	3 ± 1^a	20 ± 6	57 ± 12
Ejakulat (8)	25 ± 8^b	20 ± 6	54 ± 3	19 ± 6^b	25 ± 7	57 ± 4

Die größten Veränderungen während der Reifung ließen sich beim GPE-Gehalt feststellen (**Tabelle 18**): Dieses Lipid ließ sich bei den gewaschenen Spermien erst in einem geringen Anteil in den Spermien der Cauda finden, während es bei den Ejakulatspermien ein Viertel der Phospholipide ausmachte. Dieser Unterschied war signifikant (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 3$, $p < 0,015$). Der GPE-Gehalt in den Überständen folgte dem gleichen Trend und der Unterschied zwischen dem Überstand der Cauda-Spermien und dem der Ejakulatspermien war ebenfalls signifikant. Das SM verhielt sich dazu eher gegenläufig und nahm von 37% in Caput-Spermien bis hin zu 20% bei den Ejakulatspermien ab. In den Überständen war diese Abnahme aber nicht ganz so deutlich. GPC, das etwa die Hälfte der Phospholipide in den Spermien ausmachte, nahm in den Spermien im Laufe der Entwicklung geringfügig zu, veränderte sich im Überstand aber nicht. Die Unterschiede beim SM und GPC waren nicht signifikant.

Tabelle 19: Prozentualer Anteil verschiedener GPCs am GesamtGPC und verschiedener GPEs am GesamtGPE in Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (alle Angaben in %), ^a bzw. ^b: signifikanter Unterschied zwischen den Nebenhodenspermien der Cauda und Ejakulatspermien (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 3$, $p < 0,03$), *kursive Zahlen*: unsicherer Wert, da insgesamt sehr wenig GPE in den Proben gemessen wurde

Spermien aus (n)	Gesamtspermien						Überstand				
	ether GPC	diacyl GPC	plasm GPC	ether GPE	plasm GPE		ether GPC	diacyl GPC	plasm GPC	ether GPE	plasm GPE
Nebenhoden, caput (1)	20	36	44	0	0		67	14	19	100	0
Nebenhoden, corpus (1)	52	12	36	0	0		12	52	36	0	0
Nebenhoden, cauda (3)	19 ± 18^a	56 ± 21^a	20 ± 28	100	0		19 ± 8^a	32 ± 23	41 ± 34	100	0
Ejakulat (8)	52 ± 11^b	17 ± 11^b	30 ± 6	60 ± 11	40 ± 11		53 ± 6^b	9 ± 7	37 ± 9	64 ± 9	36 ± 9

Bei den Verhältnissen der einzelnen GPCs am GesamtGPC-Gehalt gab es bei den Spermien eine signifikante Zunahme an etherGPC nach der Ejakulation und das diacylGPC nahm signifikant ab (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 3$, $p < 0,03$). Das

etherGPC nahm im Überstand ebenfalls signifikant zu. Der Gehalt an diacylGPC in den Überständen folgte dem Trend der Abnahme. Dieser Unterschied war aufgrund der großen Standardabweichung bei den Überständen der Cauda-Spermien nicht signifikant. Die Abnahme an etherGPE und die Zunahme an plasmGPE in den Spermien und Überständen nach der Ejakulation sollte nur mit großer Vorsicht zur Kenntnis genommen werden. Die *kursiv* angegebenen 100%-Werte ergaben sich möglicherweise nur aus der Tatsache, dass das plasmGPE aufgrund der insgesamt geringen GPE-Menge nicht detektiert werden konnte.

Tabelle 20: Anteile der verschiedenen Lipidklassen am Gesamtlipidgehalt in den Banden der DRM-Präparation aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (alle Angaben in %). Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 3$, $p > 0,05$).

Spermien aus (n)	Bande a				Bande b				Bande c			
	GPE	SM	GPC	PI	GPE	SM	GPC	PI	GPE	SM	GPC	PI
NH, caput (1)	4	52	44	0	-Keine Bande-				-Keine Bande-			
NH, cauda (3)	22 ± 1	35 ± 2	42 ± 1	0	22 ± 6	33 ± 7	36 ± 10	0	20 ± 8	39 ± 5	40 ± 5	0
Ejakulat (8)	25 ± 11	28 ± 9	41 ± 6	5 ± 6	24 ± 11	26 ± 12	44 ± 5	5 ± 9	26 ± 6	29 ± 8	45 ± 9	1 ± 2

Ähnliche Veränderungen ließen sich auch in den Banden der Dichtegradienten finden, die allerdings statistisch nicht signifikant waren. Während der GPC-Gehalt eher unverändert blieb und der SM-Gehalt im Laufe der Reifung etwas abnahm, sah man beim GPE eine Zunahme im Laufe der Reifung (**Tabelle 20**) – allerdings ließ sich bereits in der Bande aus dem Caput GPE finden und eine deutliche Zunahme schien sich bereits während der Nebenhodenpassage in den für DRMs relevanten Membranbereichen abzuspielen. Die Gehalte an GPE und vor allem auch SM waren insgesamt höher als in den gewaschenen Spermien und den Überständen. Sie schienen somit in den Membranbereichen, die in den DRMs isoliert wurden, angereichert zu sein.

Tabelle 21: Prozentualer Anteil verschiedener GPCs am GesamtGPC in den Banden der Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (alle Angaben in %), ^a bzw. ^b: signifikanter Unterschied zwischen den Nebenhodenspermien der Cauda und Ejakulatspermien (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 3$, $p < 0,025$)

Spermien aus (n)	Bande a			Bande b			Bande c		
	etherGP C	diacylGP C	plasmGP C	etherGP C	diacylGP C	plasmGP C	etherGPC	diacylGP C	plasmGP C
Nebenhoden, caput (1)	-	-	100	-Keine Bande-			-Keine Bande-		
Nebenhoden, cauda (3)	51 ± 4	27 ± 14	22 ± 10	51 ± 10	22 ± 6	27 ± 9	44 ± 17	30 ± 10 ^a	25 ± 17
Ejakulat (8)	58 ± 23	22 ± 23	20 ± 13	50 ± 17	20 ± 14	30 ± 12	66 ± 19	4 ± 10 ^b	30 ± 16

Die Verhältnisse der einzelnen Phospholipidsubklassen mit den verschieden gebundenen Fettsäureresten waren zwischen den Cauda- und den Ejakulatspermien und im Vergleich zwischen den verschiedenen Banden im Rahmen der Messgenauigkeit eher gleichbleibend (**Tabelle 21**). Ein signifikanter Unterschied ließ sich lediglich beim diacylGPC in der Bande c zwischen den Cauda- und den Ejakulatspermien finden (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 3$, $p < 0,025$), denn der diacylGPC-Gehalt nahm nach dem Seminalplasmakontakt ab. Auch bei diesen Proben sollte der hohe GPE-Plasmalogengehalt in der Bande der Caput-Spermien nicht zu stark bewertet werden (**Tabelle 22**), denn der GPE-Gehalt war in dieser Bande sehr niedrig, sodass vorhandenes etherGPE möglicherweise nicht detektiert werden konnte.

Tabelle 22: Prozentualer Anteil verschiedener GPEs am GesamtGPE in den Banden der Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (alle Angaben in %), *kursive Zahlen*: unsicherer Wert, da insgesamt sehr wenig GPE gemessen wurde

Spermien aus (n)	Bande a		Bande b		Bande c	
	etherGPE	plasmGPE	etherGPE	plasmGPE	etherGPE	plasmGPE
Nebenhoden, caput (1)	0	100	-Keine Bande-		-Keine Bande-	
Nebenhoden, cauda (3)	65 ± 5	35 ± 5	67 ± 1	33 ± 1	62 ± 9	38 ± 9
Ejakulat (8)	58 ± 20	42 ± 20	62 ± 9	38 ± 9	67 ± 9	33 ± 9

4.2.4 Analyse der Lipidspezies der Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien mittels MALDI-TOF-MS

Um die einzelnen Lipide mit ihren zugehörigen Fettsäuren zu analysieren, wurden sie mittels MALDI-TOF MS analysiert. Dabei wurden nur die gewaschenen Spermien analysiert, da sich sowohl in den Überständen als auch in den Gradientenproben zu viel störendes Triton X-100 befand (siehe Einleitung Abschnitt 2.6), das die Ergebnisse verfälscht hätte.

In den Massenspektren der Ejakulatspermien (**Abbildung 16**) dominierten die GPCs mit langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäureresten (vor allem Etherlipide und Plasmalogene), sodass im Gegensatz zu den Nebenhodenspermien (**Abbildung 15**) weniger

Lipide mit kürzeren, stärker gesättigten Ketten gefunden werden konnten. Die Spektren der verschiedenen Abschnitte des Nebenhodens ähnelten sich sehr stark, es konnten überwiegend die gleichen Lipide gefunden werden. Teilweise variierten die individuellen Peakhöhen etwas, sodass der Anteil von GPCs und SMs mit kürzeren, gesättigteren Fettsäuren im Laufe der Reifung im Nebenhoden etwas zunahm. Außerdem ließ sich in den Spektren der Nebenhoden aus dem Caput und der Cauda (aber nicht bei den Spermien aus dem Corpus) und auch bei den Ejakulatspermien GPE finden (GPE 16:0 alkyl/22:5 acyl + Na⁺, m/z = 774,7). In allen Spektren ließen sich keine Lysophospholipide finden (Spektrenbereich (m/z = 450-620) nicht dargestellt).

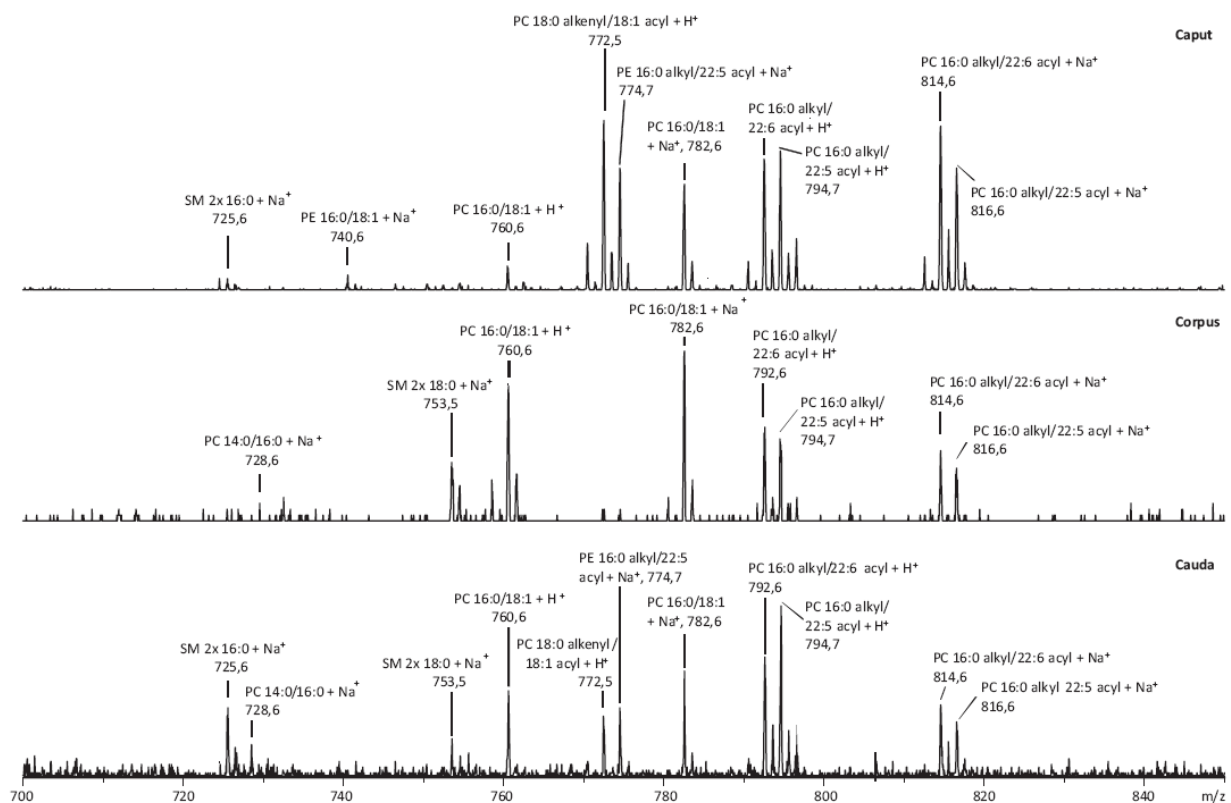


Abbildung 15: Positiv-Ionen MALDI-TOF Massenspektren (verwendete Matrix: DHB) von Spermien aus den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens des Ebers, es lassen sich die Peaks von diversen GPCs, GPEs und SM finden

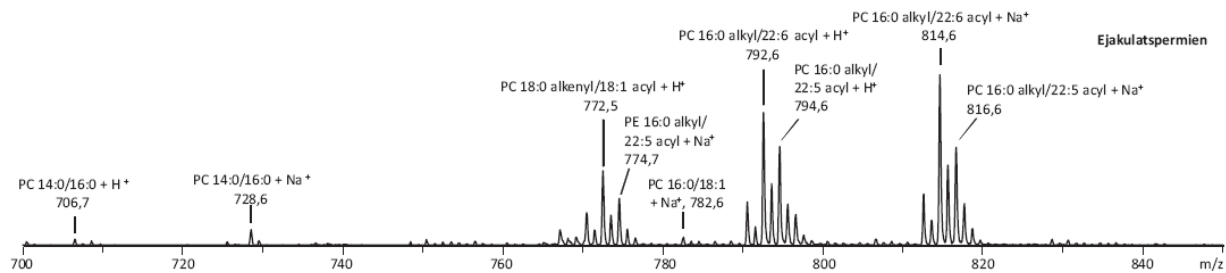


Abbildung 16: Positiv-Ionen MALDI-TOF Massenspektren (verwendete Matrix: DHB) von Ejakulatspermien des Ebers, es lassen sich die Peaks von diversen GPCs und GPE finden, wobei Etherlipide und Plasmalogene das Spektrum dominieren

4.2.5 Protein-Analyse von DRMs aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien mittels SDS-PAGE

Um zu untersuchen, ob auch in der Proteinzusammensetzung der DRMs nach der Ejakulation Veränderungen stattfinden, wurden SDS-PAGE-Analysen durchgeführt. Dabei ließen sich bei den DRMs aus Spermien vor und nach der Ejakulation (**Abbildung 17** und **Abbildung 18**) vor allem im Bereich von etwa 15-17 kDa Unterschiede finden: während bei den Banden der Nebenhodenspermien aus der Cauda keine Proteinbanden sichtbar waren, konnten bei den Banden der Ejakulatspermien vier Proteinbanden mit dicht beieinanderliegenden Massen gefunden werden. Bei den Proben aus dem Bodenbereich der Gradienten ließen sich bei Nebenhoden- und Ejakulatspermien im gleichen Bereich Proteinbanden finden, allerdings in einem leicht veränderten Mengenverhältnis. Bei der Untersuchung von Proben aus dem weiter unten liegenden Gradientenbereich der Nebenhodenspermien ließen sich jedoch auch in diesem Massenbereich, wenn auch teilweise nur schwache, Proteinbanden finden.

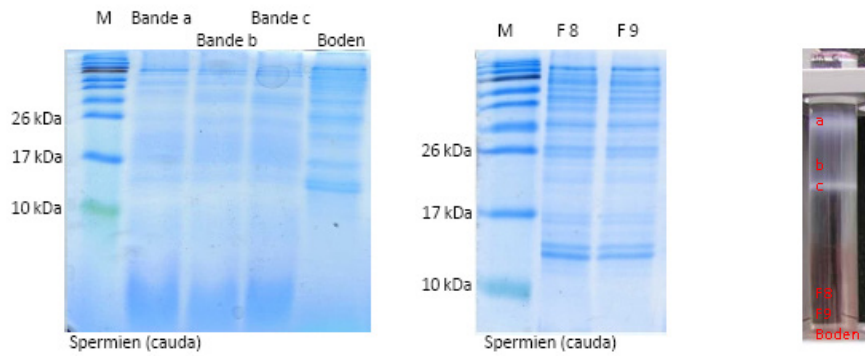


Abbildung 17: SDS-Gele der DRMs aus Nebenhodenspermien (cauda), Gel links: Gelbanden a-c und Boden, Gel rechts: Fraktionen 8 und 9 des Gradienten, zur Verdeutlichung des Ursprungs der verschiedenen Probenfraktionen ist im rechten Bildrand der zugehörige Dichtegradient mit den jeweiligen Probenbezeichnungen dargestellt

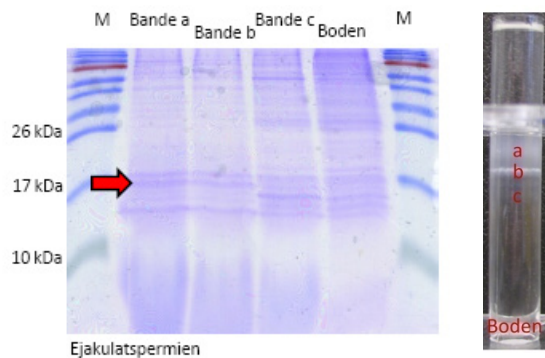


Abbildung 18: SDS-PAGE der DRMs aus Ejakulatspermien, zur Verdeutlichung des Ursprungs der verschiedenen Probenfraktionen ist im rechten Bildrand der zugehörige Dichtegradient mit den jeweiligen Probenbezeichnungen dargestellt

4.2.5.1 Identifizierung von Proteinen mittels Trypsinverdau und MALDI-TOF MS

Da sich die Proteinbanden der SDS-PAGE mit etwa 15-17 kDa im Massenbereich der sogenannten Spermadhäse befanden, wurde versucht, mittels Trypsinverdau und anschließender massenspektrometrischer Analyse der dabei entstehenden Peptide die Proteine zu identifizieren. Für die in **Abbildung 18** mit dem roten Pfeil versehene Proteinbande konnten Peptide mit den folgenden Massen gefunden werden:

1. Peptid: DSHHPASSFNVYFYGIPQGAK, m/z 2322
2. Peptid: NYSGWISYYK, m/z 1280
3. Peptid: AGPDNFLK, m/z 861

4. Peptid: EYLEVR, m/z 808

Diese Peptidmassen ließen sich mittels einer Datenbanksuche dem Protein AQN-3 zuordnen, das zur Proteinfamilie der Spermadhäsine gehört.

4.3 Analyse detergentresistenter Membrandomänen (DRMs) aus Seminalplasma

4.3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung des Pellets nach der Ultrazentrifugation

In einer Ultrazentrifugation wurde ein gelartiges Pellet aus dem Seminalplasma angereichert. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung dieses Pellets zeigte vesikelartige Strukturen mit einem Durchmesser von 50 bis 200 nm (**Abbildung 19**). Diese Pellets wurden für die Präparation detergentresistenter Membrandomänen verwendet.

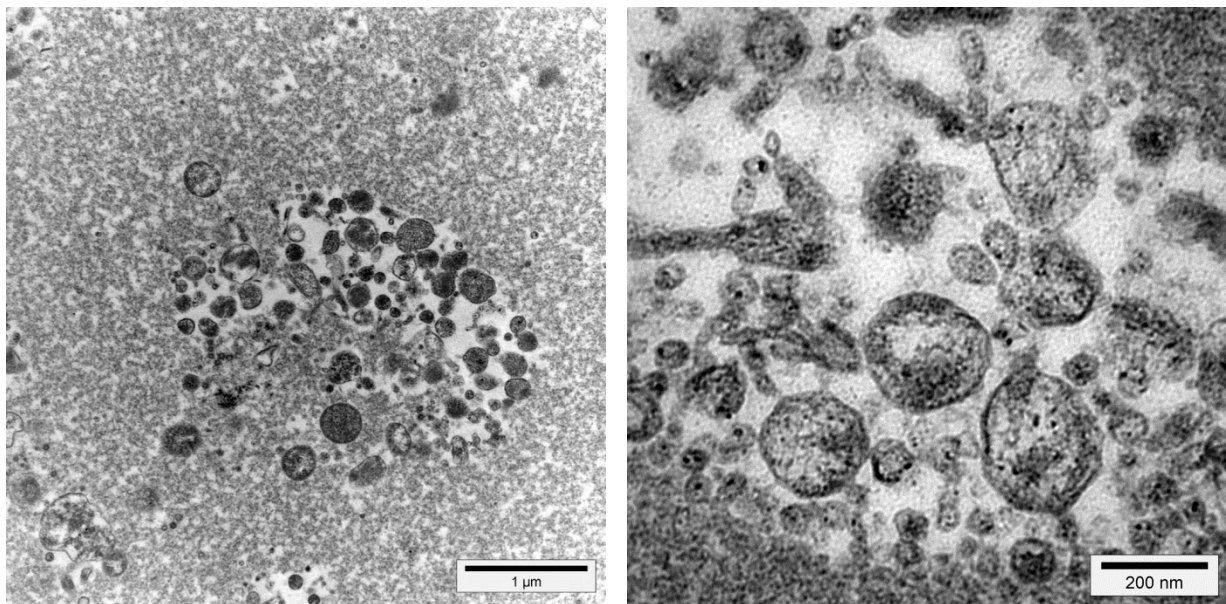


Abbildung 19: Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop der aus Seminalplasma gewonnenen, gelartigen Pellets. Deutlich sichtbar sind vesikelartige Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 50-200 nm.

4.3.2 Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation

Für die DRM-Präparation wurde das aus dem Seminalplasma isolierte gelartige Pellet eingesetzt. In den Gradienten dieser DRM-Präparation waren nach der Ultrazentrifugation

keine Trübungen sichtbar. Für die Analyse wurden daher 1,5 ml-Fractionen des Gradienten abgenommen (Fraktion 1-9, von oben nach unten).

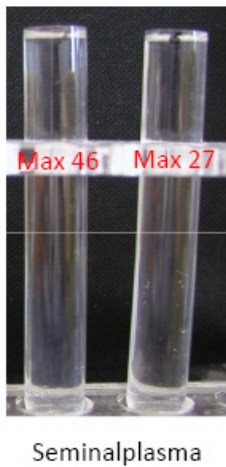


Abbildung 20: Dichtegradienten der DRM-Präparationen aus den gelartigen Pellets des Seminalplasmas nach der Ultrazentrifugation.

4.3.3 Lipid- und Proteinanalytik der Seminalplasmaproben

Tabelle 23 zeigt die Kontrollwerte der Seminalplasmaproben. Beim reinen Seminalplasma fiel der hohe Proteingehalt in Relation zum Lipidgehalt auf, der zumeist recht niedrig war. Nach der Anreicherung des Pellets in der Ultrazentrifugation war der Lipidgehalt deutlich erhöht, wobei durch die Beschaffenheit des gelartigen Pellets möglicherweise nicht alle Lipide komplett extrahiert werden konnten, auch wenn versucht wurde, das Pellet mithilfe mechanischer Bearbeitung durch Pipettieren und mit den Lösungsmitteln möglichst gut aufzulösen. Der Proteingehalt ließ sich aufgrund der hohen Viskosität der Probe nicht für diese Proben bestimmen.

Tabelle 23: Lipid- und Proteinkonzentrationen sowie Cholesterol zu Phospholipid- und Gesamtlipid zu Proteinverhältnis in den Kontrollen der Seminalplasmaproben

Probe (n)	CHO [nmol/ μ l]	PL [nmol/ μ l]	C/P	Protein [μ g/ μ l]	Lipid/Protein [nmol/ μ g]
Seminalplasma (2)	$0,06 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,11$	$0,38 \pm 0,08$	54 ± 16	$0.004 \pm 0,001$
Gelartiges Pellet (2)	$0,76 \pm 0,02$	$1,02 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,04$	nd	nd

In den anderen Fraktionen ließen sich nach der Ultrazentrifugation keine oder nur sehr geringe Lipidmengen finden, die sich an der unteren Grenze der Bestimmbarkeit mittels der verwendeten Methode befanden (Amplex-Kit, siehe 3.10.3). Der Proteingehalt war im

gesamten Gradienten gleichbleibend und lag bei $42 \pm 10 \mu\text{g} / \mu\text{l}$, entsprach also im Rahmen der Messgenauigkeit dem Proteingehalt des reinen Seminalplasmas.

Tabelle 24: Proteinkonzentration in den Fraktionen der Dichtegradienten der Triton X-100 behandelten gelartigen Pellets nach der Ultrazentrifugation.

Probe (n)	Protein [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
Fraktion 1 (2)	0
Fraktion 2 (2)	0
Fraktion 3 (2)	0
Fraktion 4 (2)	0
Fraktion 5 (2)	$0,1 \pm 0,1$
Fraktion 6 (2)	$3,1 \pm 0,9$
Fraktion 7 (2)	$4,9 \pm 1,9$
Fraktion 8 (2)	$5,6 \pm 2,9$
Fraktion 9 (2)	$6,2 \pm 3,1$

In **Tabelle 24** sind die Proteinkonzentrationen der Dichtegradienten der Pellets nach der Ultrazentrifugation dargestellt. Bei den Werten fiel auf, dass sich in den untersten vier Fraktionen das meiste Protein befand, während sich im oberen Bereich des Gradienten kein Protein finden ließ. Die gemessenen Cholesterol- und Phospholipidwerte lagen unterhalb der jeweiligen Detektionsgrenze der angewendeten Methode und wurden daher nicht ausgewertet.

4.3.4 Lipidanalyse der Seminalplasma Proben mittels ^{31}P -NMR

Bei den Seminalplasma Proben war nur in den Pellets, die in der ersten Ultrazentrifugation entstanden, ausreichend Phospholipid enthalten, um eine ^{31}P -NMR-Spektroskopie durchzuführen. Dabei ließ sich in beiden Proben kein Phosphatidylinositol messen. Dafür wurde in den Proben Phosphatidylserin gefunden, mit einem Anteil von ungefähr 10% (**Tabelle 25**). Die Anteile an Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin unterschieden sich sehr stark zwischen den Proben der beiden untersuchten Eber, die Probe von Max 27 enthielt deutlich mehr GPE (64% gegenüber 14%), während sich bei der Probe von Eber Max 46 die Verhältnisse fast umdrehten (59% SM gegenüber 25% SM bei Max 27). Im Seminalplasma pellet von Max 27 ließ sich außerdem mehr plasmGPC finden als bei Max 46, während das Seminalplasma pellet von Max 46 mehr etherGPC enthielt.

Tabelle 25: Mittels ^{31}P -NMR ermittelter prozentualer Anteil der Phospholipidklassen am Gesamtphospholipidgehalt im Seminalplasma (Pellet)

Pellet von	GPE [%]	SM [%]	GPC [%]	PS [%]	etherGPC [%]	diacylGPC [%]	plasmGPC [%]	etherGPE [%]	plasm GPE [%]
	- bezogen auf Gesamtlipidgehalt -				- bezogen auf GesamtGPC -			- bezogen auf GesamtGPE -	
Max 27	64	25	11	14	26	42	32	62	38
Max 46	14	59	16	9	45	45	10	50	50

4.3.5 Lipidanalyse der Seminalplasma (Pellets) mittels MALDI-TOF MS

Auch für die Seminalplasma (Pellets) wurde die genaue Lipidzusammensetzung mittels MALDI-TOF MS untersucht. Dabei war nur in den gelartigen Pellets ausreichend Lipid enthalten, um ein auswertbares Spektrum zu erzeugen. Außerdem befand sich in den Gradientenproben störendes Triton-X 100 (siehe Einleitung Abschnitt 2.6), das die Messung verfälscht hätte. Die Positiv-Ionen-Spektren der beiden Eber ähnelten sich hierbei sehr stark (**Abbildung 21**). In den Spektren ließen sich für Eber typische Lipide finden, bei denen die SMs und die diacylGPCs und etherGPCs dominierten: Gesättigte SMs (SM 2x 16:0 und SM 2x 18:0) und GPCs und GPE mit (mehrfach-)ungesättigten Fettsäureresten. Von den vor allem bei den Ejakulatspermien sehr prominenten Banden bei $m/z = 792,6$, $794,6$, $814,6$ und $816,6$ des GPC 16:0 alkyl/22:6 acyl bzw. des GPC 16:0 alkyl/22:5 acyl ließ sich im Seminalplasma (Pellet) nur eine sehr kleine Bande bei $m/z = 816,5$ finden.

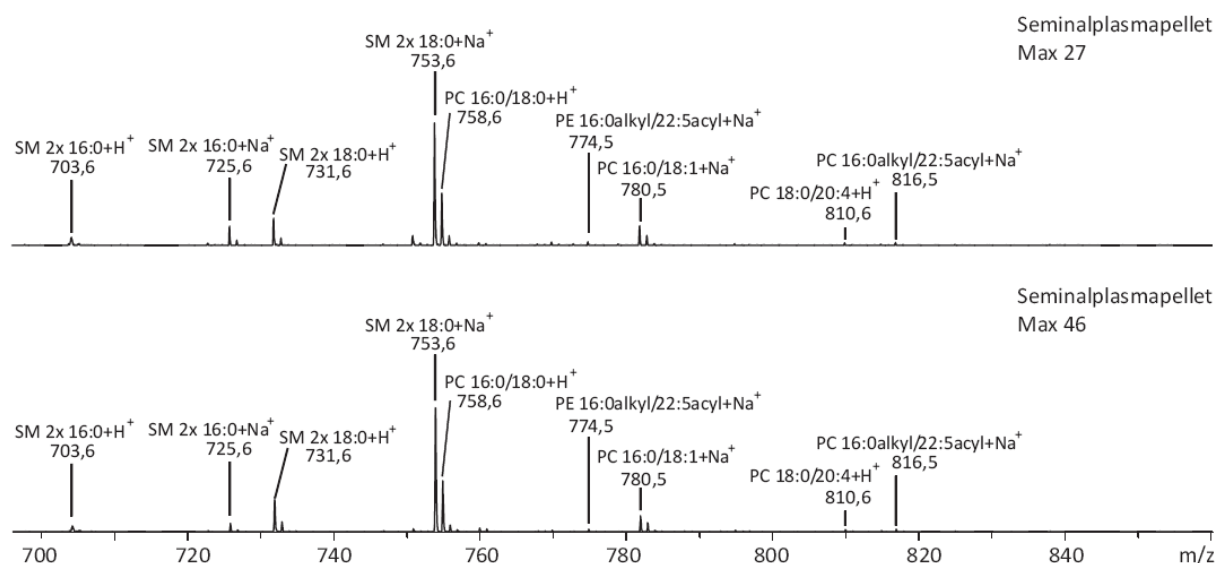


Abbildung 21: Positiv-Ionen MALDI-TOF Massenspektren (DHB) der gelartigen Pellets aus dem Seminalplasma der Eber Max 27 und Max 46 nach der ersten Ultrazentrifugation

4.3.6 Proteinanalyse der Seminalplasma (Gradientenproben) mittels SDS-PAGE

Auch bei den Gradientenproben aus dem Seminalplasma der Eberspermien ließen sich in der SDS-PAGE im Bereich von etwa 15-17 kDa sehr deutliche Proteinbanden finden (**Abbildung 22**).

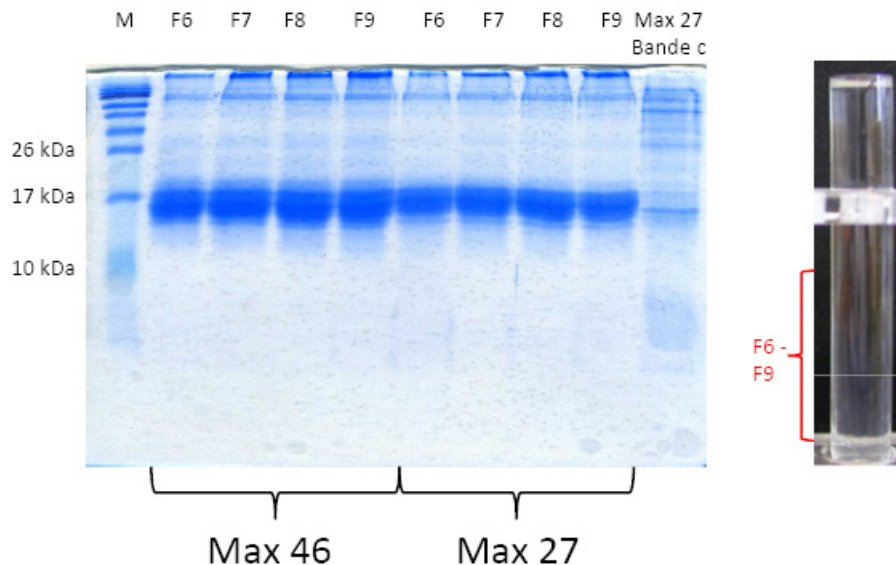


Abbildung 22: SDS-PAGE der Gradientenproben des Seminalplasmas, rechter Rand des Gels: Bande c der DRMs von Spermien von Max 27 als Vergleich, rechter Bildrand: Gradient mit dem untersuchten Gradientenbereich

4.4 DRM-Präparation aus Nebenhodenspermien nach Kontakt mit Seminalplasma

4.4.1 Motilität und Vitalität der Nebenhodenspermien mit und ohne Kontakt mit Seminalplasma und nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

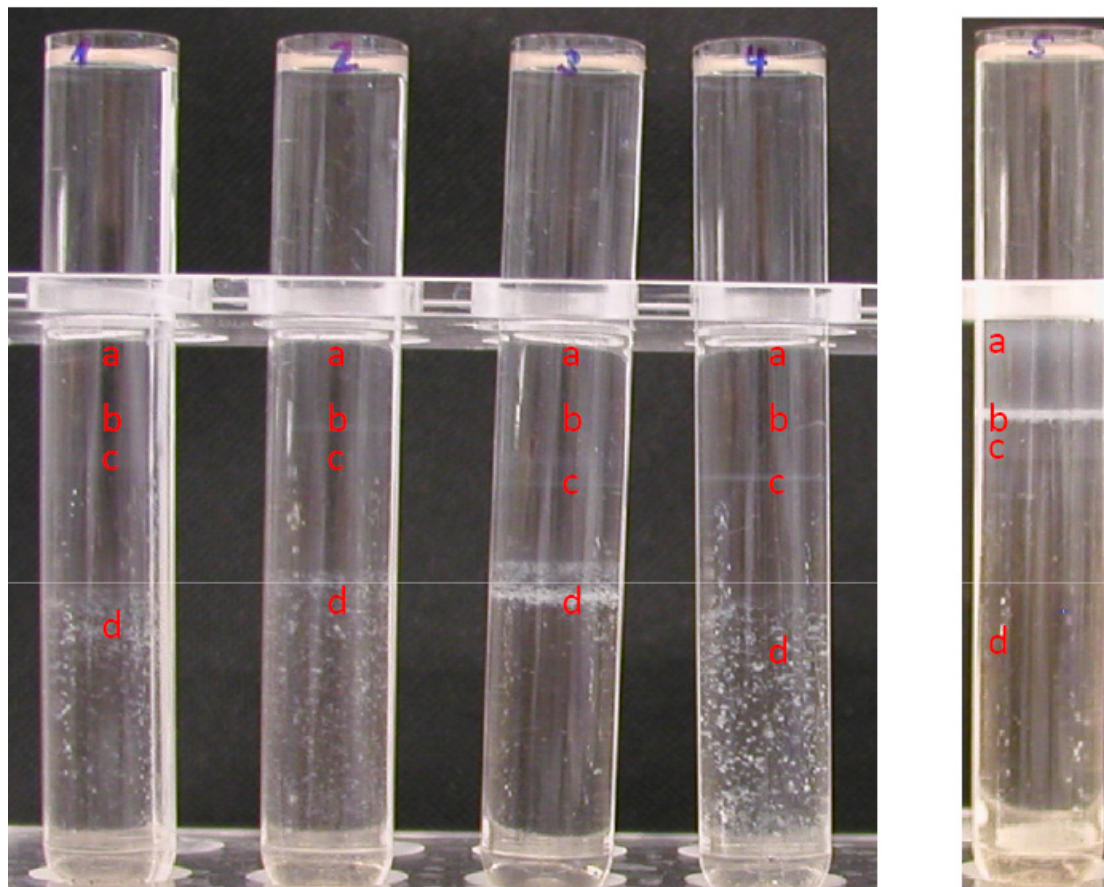
Für die Versuche wurden die Spermien aus den Nebenhoden von vier Ebern gepoolt. In Tabelle 26 sind die Motilitäts- und Vitalitätsdaten der Nebenhodenspermien nach verschiedenen Behandlungsmethoden dargestellt. Nach Isolierung aus der Cauda des Nebenhodens besaßen die Spermien direkt nach dem Präparieren im HBS-Puffer eine Motilität von 50% und einen Anteil von 40% progressiv motiler Spermien. Nach Kontakt mit Seminalplasma und 30-minütiger Inkubation bei 38°C stieg in allen Proben die Motilität auf 70% und die progressive Motilität auf 52%. Eine Lagerung über 48 Stunden bei 16°C

reduzierte die Motilität wieder auf 53% motile und 35% progressiv motile Spermien. Das Vorhandensein von Seminalplasma beeinflusste die Motilität nach 16°C-Lagerung nicht. Jedoch ließen sich in der Probe ohne Seminalplasmakontakt mit dem Flowcytometer mehr vitale Spermien feststellen (73% ohne gegenüber 41% mit Seminalplasmakontakt). Anders gestalteten sich die Daten nach 4°C-Lagerung über 48 Stunden. Bei diesen Proben wirkte sich der Kontakt mit Seminalplasma negativ auf die Motilität der Spermien aus, sodass die Motilität der Nebenhodenspermien ohne Seminalplasmakontakt mit 47% höher war als bei den Spermien mit Seminalplasmakontakt (31%). Auch die Vitalität der Spermien ohne Seminalplasmakontakt lag mit 71% über den Werten der Spermien mit Seminalplasmakontakt (41%). Insgesamt waren die Motilitätswerte nach 4°C-Lagerung gegenüber der höheren Lagerungstemperatur reduziert, während sich bei den Vitalitätsdaten kein Unterschied feststellen ließ. Die Herkunft des Seminalplasmas, d. h. der Donoreber, beeinflussten die Motilität und Vitalität der Spermien nicht.

Tabelle 26: Motilitäts- und Vitalitätsdaten der Nebenhodenspermien nach verschiedenen Behandlungen: direkt nach der Isolierung aus dem Nebenhoden nur in HBS-Puffer, nach 30 Minuten Inkubation bei 38°C mit Seminalplasma, nach 48 Stunden Lagerung bei 16°C bzw. 4°C mit und ohne Seminalplasmakontakt (SP = Seminalplasma)

Behandlung der Spermien (n)	Motile Spermien [%]	Progressiv motile Spermien [%]	Vitale Spermien [%]
Nebenhodenspermien in HBS (1)	49	40	nd
30 min bei 38°C Inkubation mit SP (4)	70 ± 7	52 ± 7	nd
48 h Lagerung bei 16°C ohne SP (1)	52	38	73
48 h Lagerung bei 16°C mit SP (4)	54 ± 3	34 ± 10	41 ± 6
48 h Lagerung bei 4°C ohne SP (1)	47	26	71
48 h Lagerung bei 4°C mit SP (4)	31 ± 3	8 ± 2	41 ± 2

4.4.2 Dichtegradienten der Nebenhodenspermien mit Seminalplasmakontakt nach der Ultrazentrifugation



Nebenhodenspermien mit Seminalplasma

ohne SP

Abbildung 23: Dichtegradienten der DRM-Präparation aus Nebenhodenspermien mit und ohne Kontakt mit Seminalplasma (SP = Seminalplasma). In den Gradienten der Nebenhodenspermien mit Seminalplasmakontakt sind im mittleren Dichtebereich wenige schwache Banden sichtbar und eine flockige Trübung im unteren Bereich (d) des Gradienten. Das Bandenmuster der Nebenhodenspermien ohne Seminalplasmakontakt (rechts) weicht deutlich davon ab.

In den Dichtegradienten der DRM-Präparationen aus Nebenhodenspermien, die Kontakt mit Seminalplasma hatten, war eine flockige Trübung im unteren Dichtebereich des Gradienten sichtbar (ab einer Dichte von $1,14 \text{ g/cm}^3$). Zudem ließen sich vereinzelt sehr feine Banden bei einer Dichte von $1,11 \text{ g/cm}^3$ - $1,12 \text{ g/cm}^3$ finden. Das Bandenmuster unterschied sich deutlich von den Bandenmustern der Ejakulatspermien (**Abbildung 14**) sowie der Nebenhodenspermien ohne Seminalplasmakontakt.

4.4.3 Lipid- und Proteinmengen der Nebenhodenspermien mit Seminalplasmakontakt

Die Lipid- und Proteinmengen in den gewaschenen Nebenhodenspermien unterschieden sich nicht zwischen den mit Seminalplasma behandelten Proben und denen ohne Behandlung (Tabelle 27). Sie fielen insgesamt etwas geringer aus, als bei den zuvor gemessenen Nebenhodenspermien (Tabelle 14).

Tabelle 27: Lipid- und Proteinmengen sowie Cholesterol zu Phospholipid- und Lipid zu Proteinverhältnisse in den gewaschenen Spermienproben der Nebenhodenspermien mit und ohne Kontakt mit Seminalplasma

Probe (n)	CHO pro 1 Mio Spermien [nmol]	PL pro 1 Mio Spermien [nmol]	CHO/PL [nmol/nmol]	Protein pro 1 Mio Spermien [µg]	Lipid/Protein [nmol/µg]
Nebenhodenspermien ohne SP (1)	0,47	1,09	0,44	5,3	0,30
Nebenhodenspermien mit SP (4)	0,44 ± 0,05	1,03 ± 0,11	0,43 ± 0,03	4,9 ± 0,9	0,31 ± 0,05

In den Banden a und b ließen sich bei den mit Seminalplasma behandelten Nebenhodenspermien keine bzw. kaum Lipide und Proteine finden, wohingegen bei den unbehandelten Nebenhodenspermien Lipide und Proteine gemessen werden konnten (Tabelle 28). Bei den anderen beiden Banden (c und d) lassen sich im Rahmen der Messgenauigkeit keine Unterschiede in den Lipid- und Proteinmengen zwischen den mit Seminalplasma inkubierten Nebenhodenspermien und den unbehandelten Nebenhodenspermien finden.

Tabelle 28: Lipid- und Proteinmengen sowie Cholesterol zu Phospholipid- und Lipid zu Proteinverhältnisse in den isolierten Bereichen der DRM-Gradienten. Angegeben sind die absoluten Mengen in den Banden bzw. isolierten Fraktionen.

Probe (n)	Cholesterol [nmol]	Phospholipid [nmol]	CHO/PL [nmol/nmol]	Protein [mg]	Lipid/Protein [nmol/µg]
Bande a ohne SP (1)	122	305	0,40	97	4,38
Bande a mit SP (4)	0 ± 0	14 ± 7	0,00 ± 0,00	0 ± 0	0,00 ± 0,00
Bande b ohne SP (1)	93	293	0,32	148	2,60
Bande b mit SP (4)	2 ± 4	33 ± 13	0,04 ± 0,08	31 ± 44	6,08 ± 8,12
Bande c ohne SP (1)	55	127	0,43	105	1,74
Bande c mit SP (4)	48 ± 27	250 ± 137	0,21 ± 0,11	370 ± 298	1,19 ± 1,03
Bande d ohne SP (1)	139	570	0,24	819	0,87
Bande d mit SP (4)	134 ± 28	409 ± 126	0,38 ± 0,26	966 ± 391	0,68 ± 0,40

4.4.4 ³¹P-NMR Analyse der Nebenhodenspermien mit Seminalplasmakontakt

Um zu überprüfen, ob der Seminalplasmakontakt in den Nebenhodenspermien die Anteile der unterschiedlichen Lipidklassen verändert hatte, wurden diese Proben mittels ³¹P-NMR analysiert. Wegen der recht geringen Lipidkonzentrationen wurden die Banden a – c vor der

NMR-Messung vereinigt, um sie der Messung zugänglich zu machen und auswertbare Ergebnisse zu erhalten.

Tabelle 29: Mittels ^{31}P -NMR bestimmter prozentualer Anteil der Lipidklassen am Gesamtlipidgehalt der gewaschenen Spermien, der vereinigten Banden a bis c der Dichtegradienten und der Bande d der Dichtegradienten von den Nebenhodenspermien mit und ohne Seminalplasmakontakt

Probe (n)	GPE [%]	SM [%]	GPC [%]	PI [%]
NH, nativ (1)	11	20	56	0
NH + SP, nativ (4)	14 ± 4	23 ± 3	53 ± 1	0
NH, Bande a-c (1)	14	37	41	8
NH + SP, Bande a-c (4)	28 ± 11	15 ± 11	57 ± 1	0
NH, Bande d (1)	13	23	63	1
NH + SP, Bande d (4)	20 ± 5	19 ± 4	49 ± 6	0

Der Gehalt an GPE war in den mit Seminalplasma behandelten Nebenhodenspermien gegenüber den Nebenhodenspermien ohne eine vorhergehende Inkubation mit Seminalplasma etwas erhöht (**Tabelle 29**). Auch in den Banden war der GPE-Gehalt nach Seminalplasmabehandlung etwas höher. Der Gehalt an SM in den Banden a – c verhielt sich gegenläufig dazu und nahm nach Seminalplasmakontakt ab. Allerdings wichen die Nebenhodenwerte ohne Seminalplasmabehandlung auch etwas von denen der anderen Nebenhodenmessungen ab (siehe **Tabelle 18** und **Tabelle 20**). Es ist aber zu beachten, dass auch das Bandenmuster der Kontrollproben des Seminalplasmainkubationsversuchs von dem der anderen Dichtegradienten abwich (vgl. **Abbildung 14** und **Abbildung 23**). Daher wurden die Werte aus diesem Versuch nicht mit den Werten der anderen Nebenhodenspermienproben gemischt.

Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen wurden in den Banden der Nebenhodenspermien dieses Inkubationsversuchs auch geringe Menge an PI gefunden, allerdings nur in der Kontrollprobe, nicht in den mit Seminalplasma inkubierten Proben.

Tabelle 30: Mittels ^{31}P -NMR bestimmter prozentualer Anteil der einzelnen GPCs und GPEs bezogen auf den Gesamtgehalt der jeweiligen Lipidklasse der gewaschenen Spermien, der vereinigten Banden a bis c der Dichtegradienten und der Bande d der Dichtegradienten von den Nebenhodenspermien mit und ohne Seminalplasmakontakt

Probe (n)	etherGPC [%]	diacylGPC [%]	plasmGPC [%]	etherGPE [%]	plasmGPE [%]
NH, nativ (1)	47	46	7	15	85
NH + SP, nativ (4)	50 ± 17	14 ± 8	37 ± 23	17 ± 13	83 ± 13
NH, Bande a-c (1)	40	36	24	66	34
NH + SP, Bande a-c (4)	55 ± 3	14 ± 10	31 ± 9	47 ± 21	52 ± 23
NH, Bande d (1)	2	82	16	23	77
NH + SP, Bande d (4)	48 ± 9	26 ± 15	25 ± 6	35 ± 7	65 ± 7

In **Tabelle 30** sind die Anteile der verschiedenen GPCs und GPEs in den Proben dargestellt. Nach Seminalplasmakontakt wurde der Gehalt an diacylGPC geringer. Der Gehalt an plasmGPC nahm durch den Seminalplasmakontakt zu. Das Verhältnis von etherGPE und plasmGPE veränderte sich nach Seminalplasmakontakt nicht.

Bei den Banden gab es ebenfalls Unterschiede hinsichtlich der einzelnen GPCs zwischen den Proben mit und ohne Seminalplasmakontakt. So nahm nach Seminalplasmakontakt der Gehalt an etherGPC zu und der Gehalt an diacylGPC ab, vor allem bei der Bande d. Bezieht man allerdings die bereits zuvor gemessenen Werte der Nebenhodenspermien mit ein, scheinen die Werte insgesamt recht variabel zwischen den verschiedenen Nebenhodenspermienproben. Der Anteil der beiden verschiedenen GPEs veränderte sich im Rahmen der Messgenauigkeit nicht.

4.4.5 Proteinanalyse der Nebenhodenspermien mit Seminalplasmakontakt mittels SDS-PAGE

Die SDS-PAGE sollte überprüfen, ob sich in den DRMs der mit Seminalplasma inkubierten Nebenhodenspermien ähnlich Bandenmuster finden ließen, wie bei den Ejakulatspermien. Auch bei diesen Proben ließen sich in der SDS-PAGE Proteinbanden im Bereich von 15-17 kDa finden (**Abbildung 24**). Die weiteren Proben konnten aufgrund zu geringer Proteinmengen nicht analysiert werden.

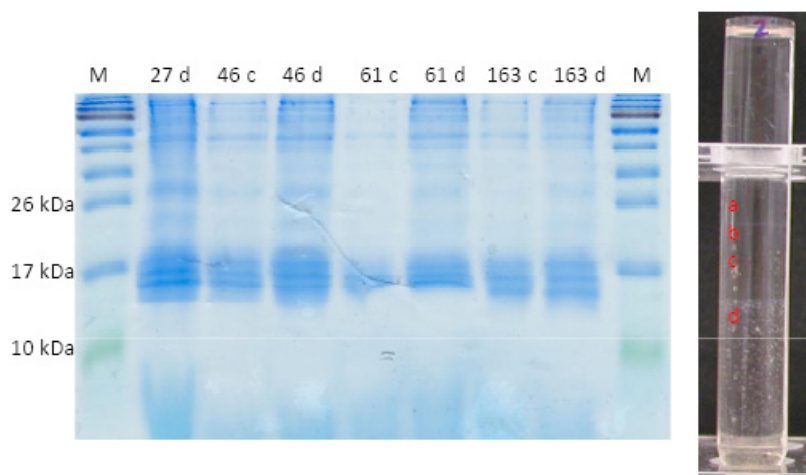
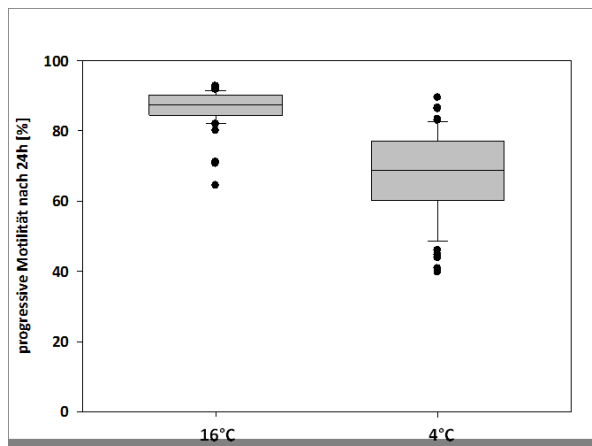


Abbildung 24: SDS-PAGE der DRMs aus Nebenhodenspermien, die mit Seminalplasma inkubiert wurden

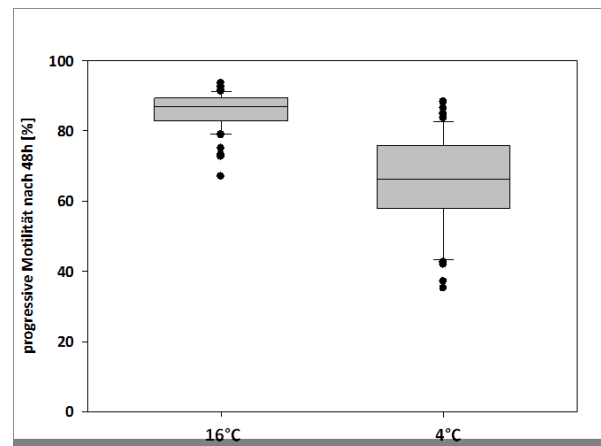
4.5 Kälteverträglichkeit von Eberspermien

4.5.1 Reaktion von Eberspermien verschiedener Individuen auf die Lagerung bei tiefen Temperaturen

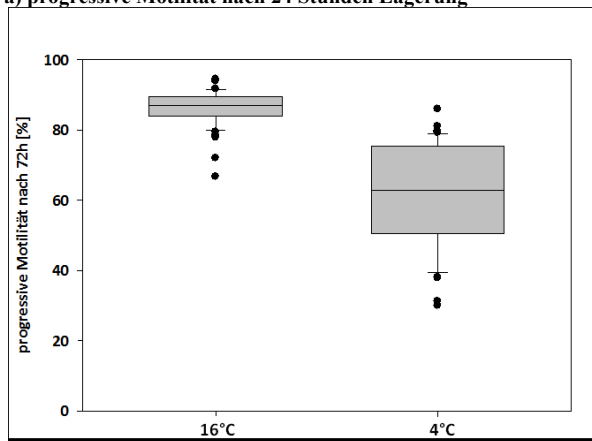
Eberspermien verschiedener Individuen einer Besamungseberstation wurden hinsichtlich ihrer Reaktion auf die Lagerung bei 4°C im Vergleich zur herkömmlichen Lagerung bei 16°C getestet. Die folgenden Diagramme zeigen die Werte der getesteten Ejakulate in den verschiedenen Spermienparametern (progressive Motilität nach 24, 48 und 72 Stunden, Thermoresistenztest nach 48 Stunden, Anteil der Kopfkappendefekte nach 72 Stunden, Anteil membranintakter Spermien nach 48 Stunden und Keimzahlbestimmung nach 48 Stunden) jeweils im Vergleich nach 16°C- und 4°C-Lagerung.



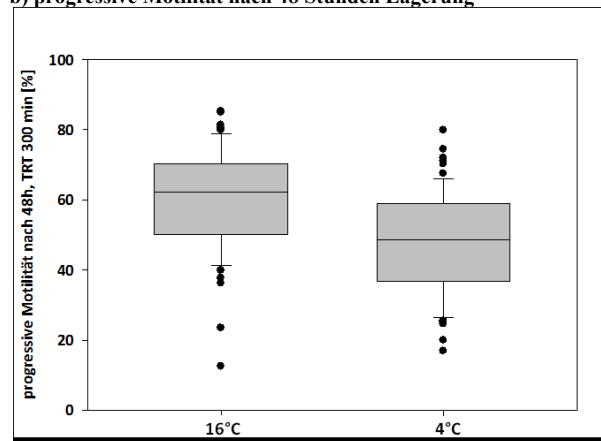
a) progressive Motilität nach 24 Stunden Lagerung



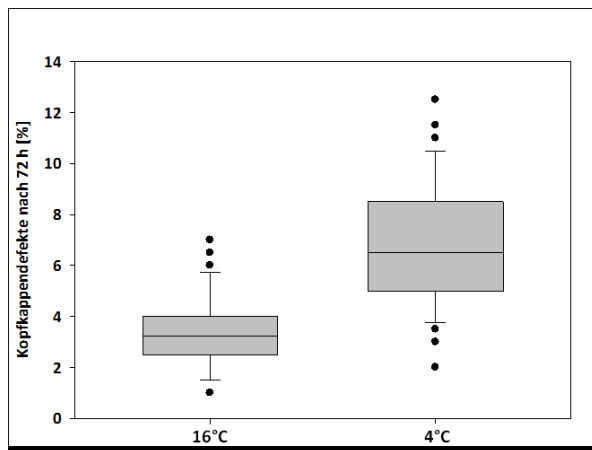
b) progressive Motilität nach 48 Stunden Lagerung



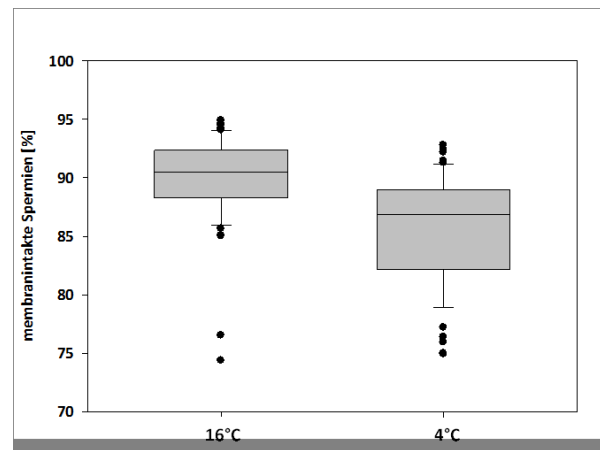
c) progressive Motilität nach 72 Stunden Lagerung



d) progressive Motilität nach 48 Stunden Lagerung (Thermoresistenztest – 300 min bei 38°C)



e) Kopfkappendefekte nach 72 Stunden Lagerung



f) Anteil membranintakter Spermien nach 48 Stunden Lagerung

Abbildung 25: Die Abbildungen a-f zeigen Boxplots der verschiedenen Spermienparameter der Eberspermien, die bei 16°C bzw. 4°C gelagert wurden (n = 64), gezeigt wird a) die progressive Motilität nach 24 Stunden Lagerung, b) die progressive Motilität nach 48 Stunden Lagerung, c) die progressive Motilität nach 72 Stunden Lagerung, d) ein Thermoresistenztest (300 Minuten bei 38°C) nach 48 Stunden Lagerung, e) die Kopfkappendefekte nach 72 Stunden Lagerung und f) der Anteil membranintakter Spermien nach 48 Stunden Lagerung. Man sieht stets deutliche Unterschiede dieser verschiedenen Qualitätsparameter zwischen beiden Lagerungstemperaturen.

In den Boxplots der verschiedenen Spermienparameter (**Abbildung 25** a)-f)) sieht man jeweils einen deutlichen Unterschied zwischen den bei 16°C und den bei 4°C gelagerten Proben. Die bei der niedrigeren Temperatur gelagerten Spermien waren im Mittel qualitativ schlechter. Der Unterschied zwischen beiden Lagerungstemperaturen war in den untersuchten Parametern stark signifikant (Wilcoxon, n = 64, $p < 0,001$). Bei den Motilitätsdaten gab es allerdings stets einige Ausreißer, die bei beiden Temperaturen nahezu die gleichen Motilitätswerte zeigten, zumeist waren dies bei den verschiedenen Parametern auch die gleichen Ejakulate. Die Streuung innerhalb einer Probengruppe war bei den bei 4°C gelagerten Proben stets größer als in den Kontrollgruppen der 16°C-Lagerung. Nur beim Thermoresistenztest streuten auch die 16°C gelagerten Ejakulate recht stark. Zudem ließ sich beobachten, dass die Unterschiede in der progressiven Motilität zwischen beiden Lagerungstemperaturen über den Lagerungszeitraum hinweg zunahmen.

Die Keimbelastung der verdünnten Ejakulate (**Abbildung 26**) war in den bei 16°C gelagerten Proben signifikant höher als bei der niedrigeren Lagerungstemperatur (Wilcoxon, n = 64, $p < 0,05$).

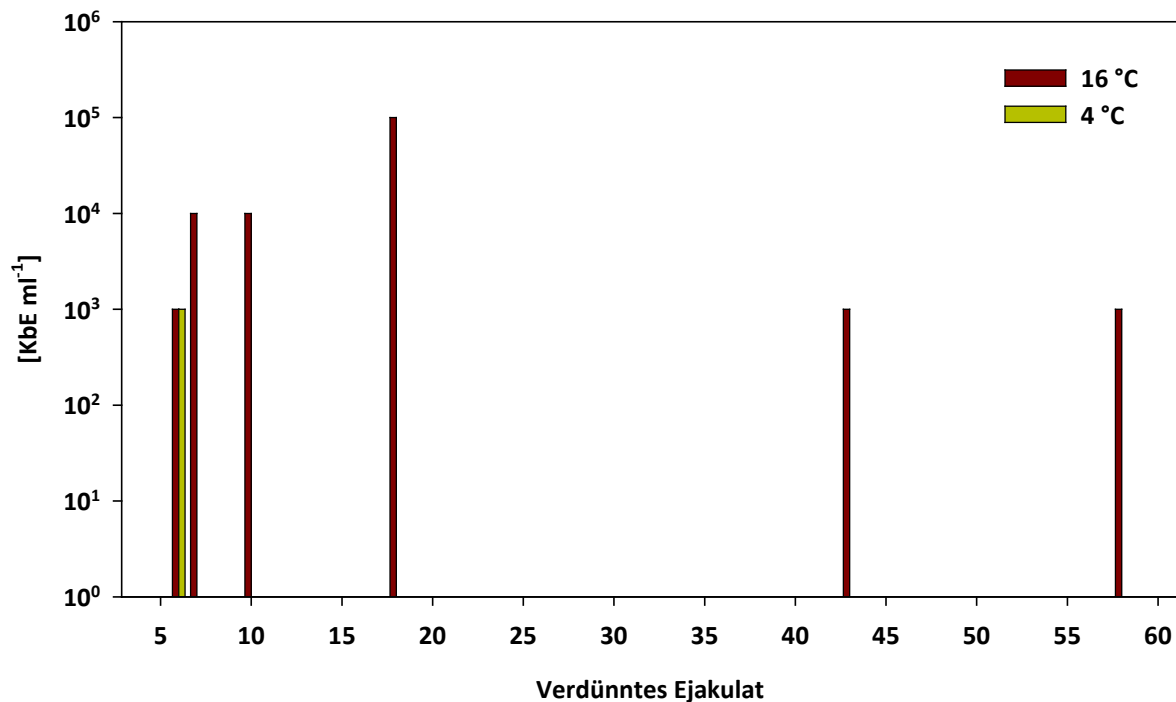


Abbildung 26: Keimbelastung der verdünnten Ejakulate nach 48 Stunden Lagerung. Es waren deutlich mehr Proben nach der Lagerung bei 16°C mit Keimen belastet. Nach der Lagerung bei 4°C konnten nur in einer Probe Keime detektiert werden – die zugehörige 16°C-Proben war ebenfalls kontaminiert.

4.5.2 Reaktion verschiedener Ejakulate ausgewählter Eber auf die Lagerung bei tiefen Temperaturen

In einem Zeitraum von 6 bis zu 16 Monaten wurden mindestens sieben Eberejakulate von acht ausgewählten Individuen wiederholt untersucht. Dafür wurden die flüssigkonservierten Spermien parallel bei 16°C bzw. 4°C gelagert und ihre Motilität und progressive Motilität nach 24, 48 und 72 Stunden untersucht. Die Motilitäten und progressiven Motilitäten der einzelnen Eber sind in den folgenden Diagrammen (Abbildung 27 und Abbildung 28) dargestellt:

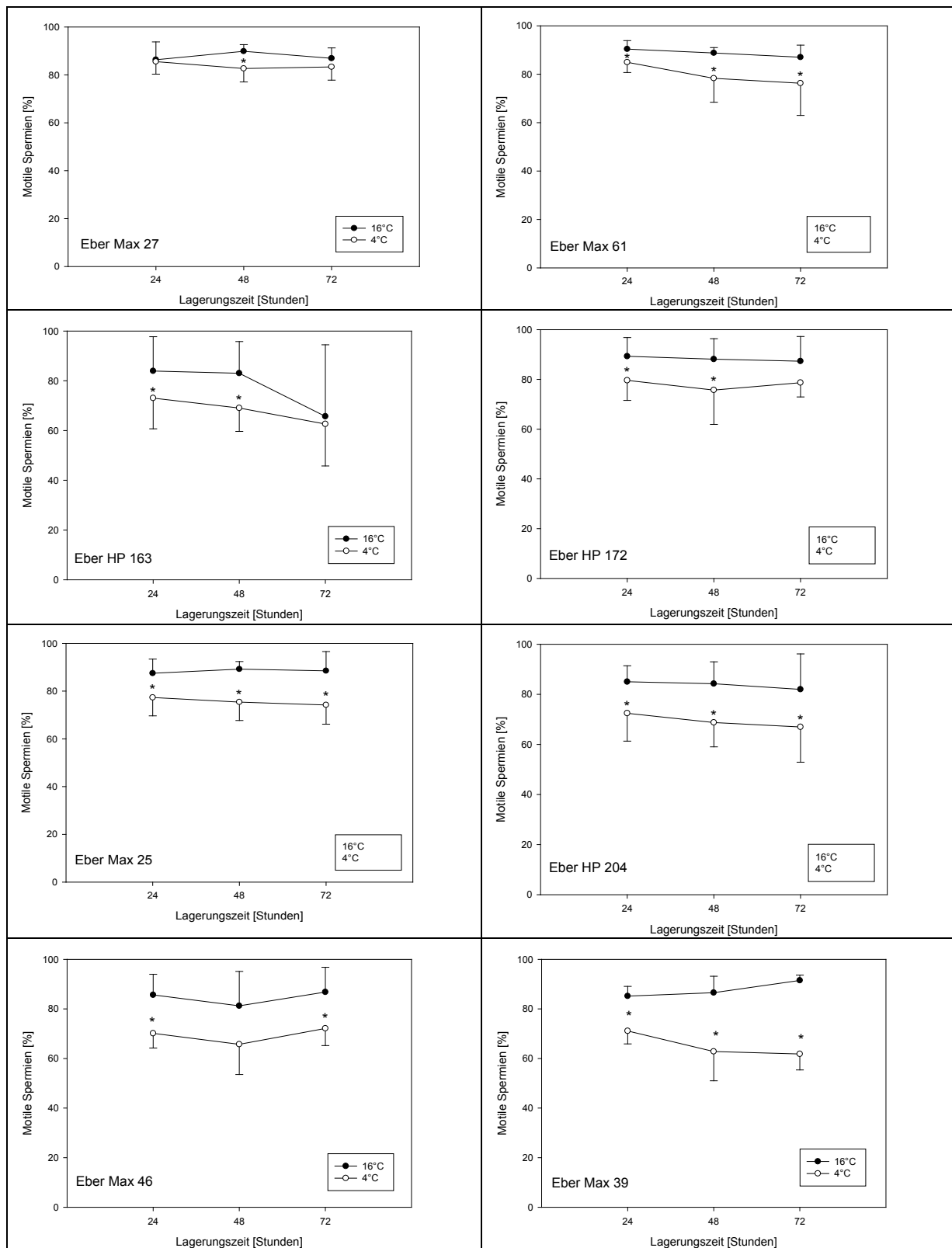


Abbildung 27: Motilitätsdaten von Eberspermien mehrerer Ejakulate einzelner Individuen nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen; signifikante Motilitätsunterschiede (Wilcoxon exakt, $n \geq 7$, $p < 0,05$) zwischen beiden Lagerungstemperaturen sind mit Sternchen (*) markiert. Die Motilität war nach 4°C-Lagerung stets geringer als nach 16°C-Lagerung.

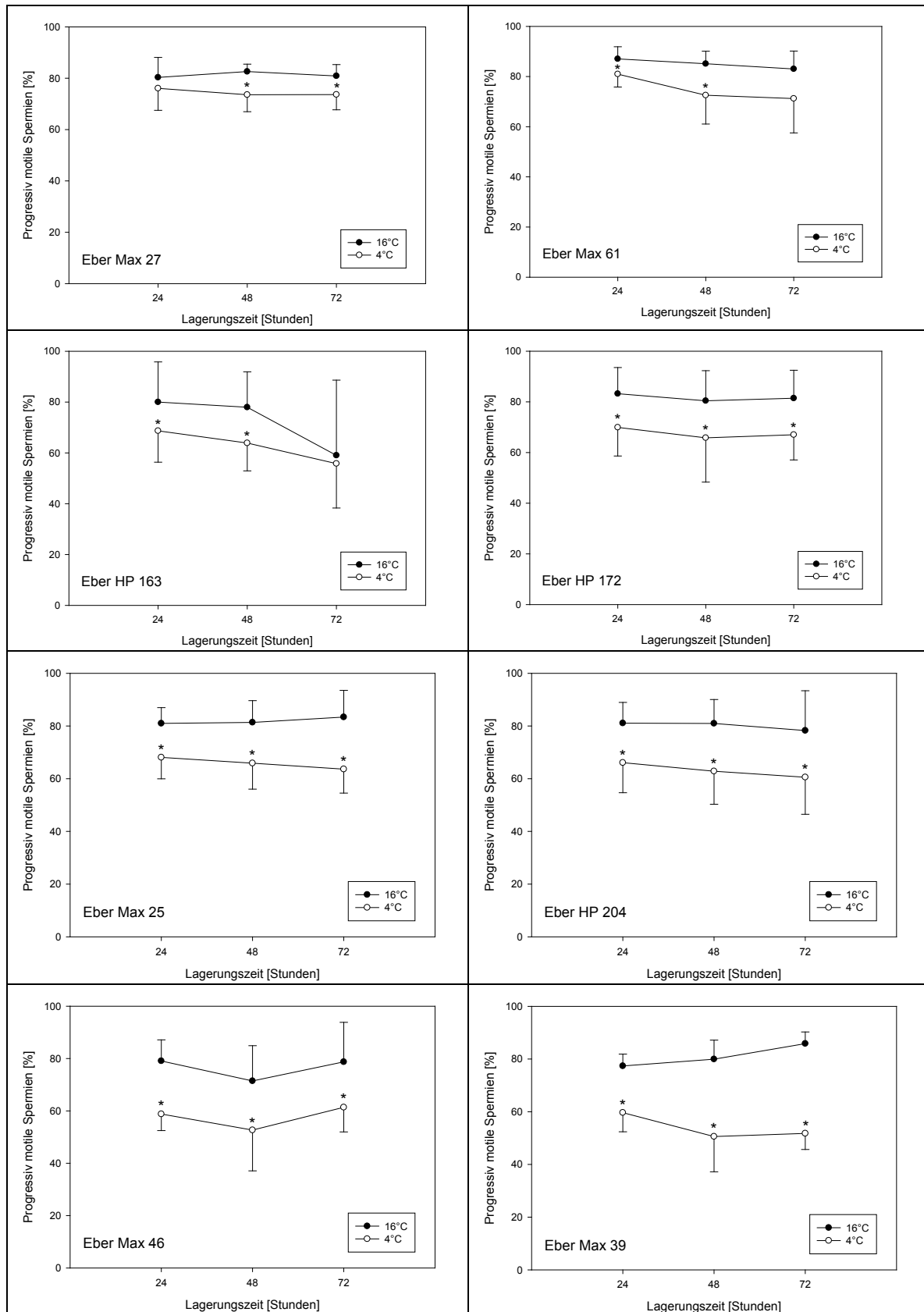


Abbildung 28: Progressive Motilitätsdaten von Eberspermien mehrerer Ejakulate einzelner Individuen nach Lagerung bei 16°C bzw. 4°C; signifikante Motilitätsunterschiede (Wilcoxon exakt, $n \geq 7$, $p < 0,05$) zwischen beiden Lagerungstemperaturen sind mit Sternchen (*) markiert. Die progressive Motilität war nach 4°C-Lagerung stets geringer als nach 16°C-Lagerung.

In Tabelle 44 (siehe Anhang) und den Diagrammen in Abbildung 27 und Abbildung 28 findet man die Motilitätsdaten ausgewählter Eber, die aus mindestens sieben unabhängigen Ejakulaten dieser Eber gesammelt wurden. Man sieht eine deutliche Streuung in der Reaktion auf die Lagerung bei 4°C im Vergleich zur Lagerung bei 16°C, aber bei allen Werten waren stets die Motilität und die progressive Motilität nach Lagerung bei 4°C geringer als nach Lagerung bei 16°C. Allerdings zeigten die Ejakulate von Eber Max 27 relativ geringe Unterschiede in der Motilität zwischen den beiden Lagerungstemperaturen. Auch bei den Spermien von Eber Max 61 waren die Unterschiede zwischen beiden Temperaturen eher gering. Die Spermien von Eber Max 46 und Eber Max 39 reagierten besonders empfindlich auf die Lagerung bei 4°C und zeigten die größten Motilitätsunterschiede zwischen beiden Lagerungstemperaturen. Statistisch ließ sich kein Unterschied in den Motilitätswerten bei den 16°C-Proben zwischen allen Ebern finden (Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben, Motilität nach 24 Stunden $p < 0,29$; nach 48 Stunden $p < 0,52$; nach 72 Stunden $p < 0,19$), während sich diese Werte bei den 4°C-Proben in Abhängigkeit vom Eber signifikant unterscheiden (Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben: Motilität nach 24 Stunden $p < 0,002$; nach 48 Stunden $p < 0,003$; nach 72 Stunden $p < 0,0005$). Beim Vergleich der Motilitätswerte in Abhängigkeit von der Temperatur für die einzelnen Eber besteht bei den meisten Ebern ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur (Wilcoxon exakt, $n \geq 7$, $p < 0,05$). Diese Signifikanzen sind mit * in Abbildung 27 und Abbildung 28 gekennzeichnet. Wie aus den Diagrammen ersichtlich, ließen sich auch bei den Ebern Max 27 und Max 61 teilweise signifikante Unterschiede der Werte zwischen beiden Lagerungstemperaturen feststellen. Diese sind auf die recht geringen Standardabweichungen zurückzuführen – die absolute Differenz zwischen beiden Lagerungstemperaturen war bei den Ebern Max 27 und Max 61 trotzdem deutlich geringer als bei den anderen Ebern. Bei diesen wiederum ließen sich teilweise keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Lagerungstemperaturen feststellen, auch wenn die Differenzen zwischen den Werten beider Temperaturen deutlich größer waren. Dies lag an den teilweise sehr großen Standardabweichungen zwischen den einzelnen Messwerten, die Variation war zwischen den Einzelejakulaten recht hoch.

4.5.3 Präparation und Analyse detergentenresistenter Membrandomänen aus Eberspermien mit unterschiedlicher Kälteresistenz

4.5.3.1 Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation

Bei der Präparation von DRMs aus Spermien mit unterschiedlicher Kältetoleranz fiel bei den Dichtegradienten auf, dass bei den kältesensitiven Spermien (Eber Max 46) eine zusätzlich Bande auftrat, die bei den kälteresistenten Spermien (Eber Max 27) nicht beobachtet werden konnte (siehe **Abbildung 29**).

Dies ließ sich bei der Wiederholung mit weiteren Ebern (**Abbildung 30** und **Abbildung 31**) jedoch nicht bestätigen. Der Vergleich der Gradienten der verschiedenen Eber bei den unterschiedlichen Temperaturen zeigte, dass das Bandenmuster variierte. Auch die Wiederholungen der Eber Max 27 und Max 46 bei 4°C mit einem neuen Ejakulat zeigten kein identisches Bandenmuster. Allerdings war allen Gradienten gemein, dass sich die sichtbaren Banden im mittleren Dichtebereich bei etwa 1,11-1,14 g / cm³ befanden.

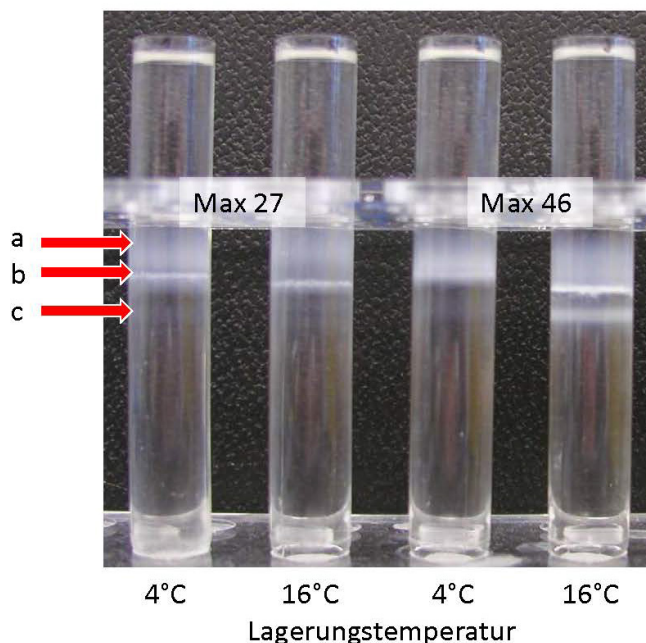


Abbildung 29: Dichtegradienten von DRM-Präparationen der Spermien von ausgewählten Ebern nach 24 Stunden Lagerung bei 16°C und 4°C.

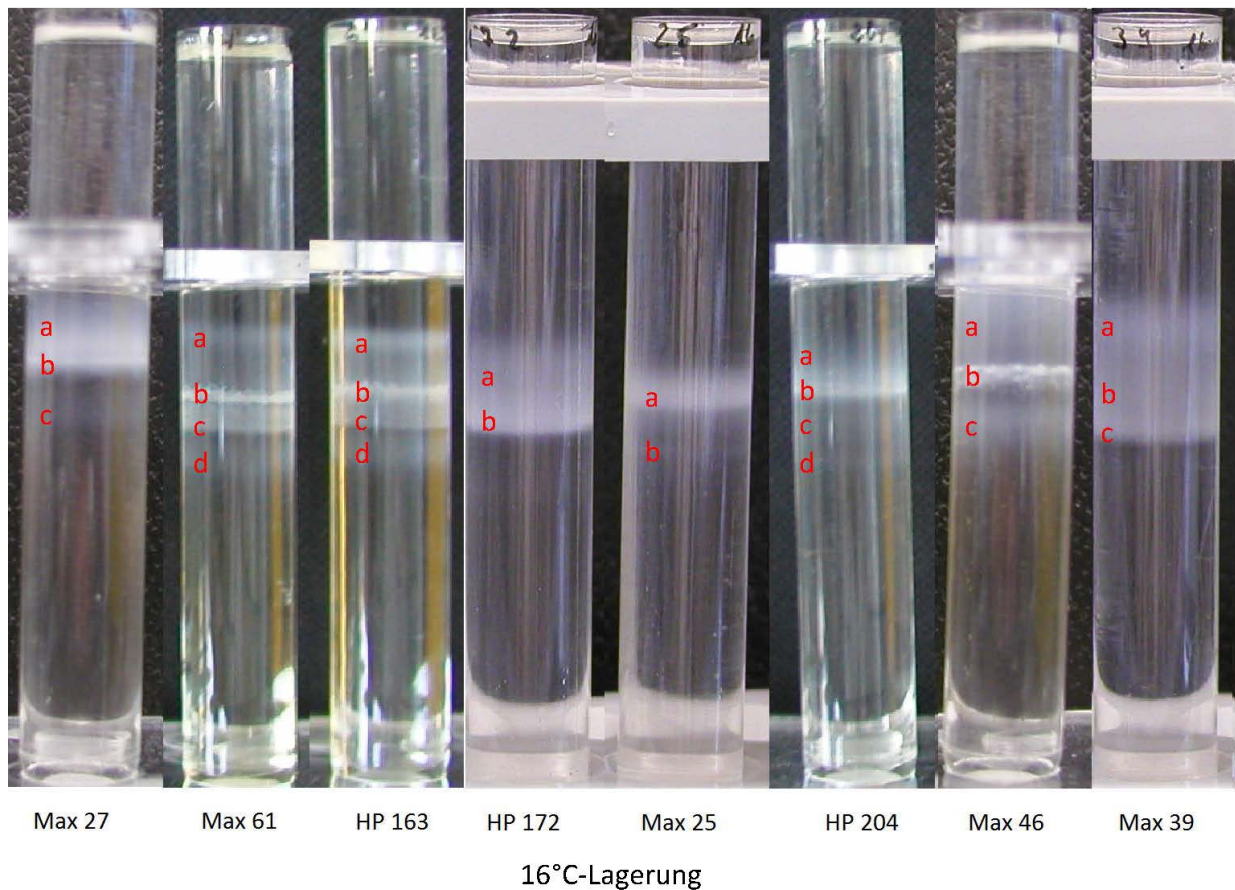


Abbildung 30: Dichtegradienten von DRM-Präparationen der Spermien von ausgewählten Ebern nach 24 Stunden Lagerung bei 16°C

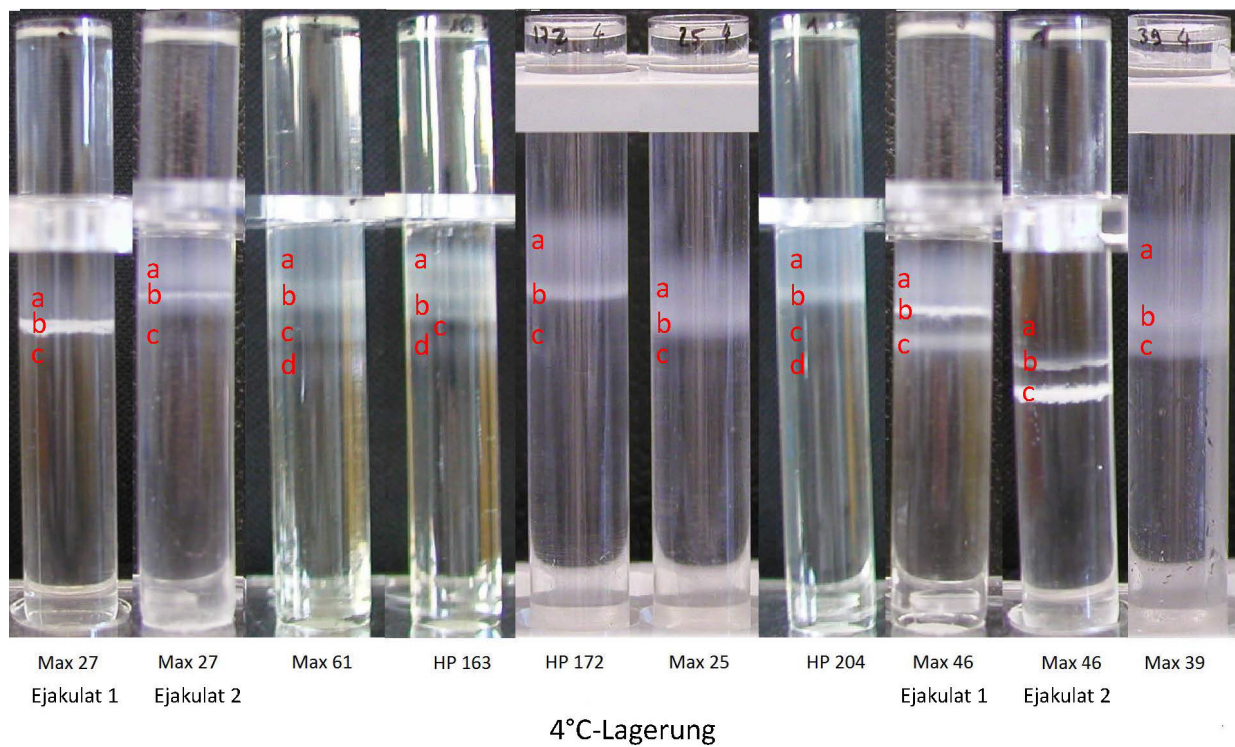


Abbildung 31: Dichtegradienten von DRM-Präparationen der Spermien von ausgewählten Ebern nach 24 Stunden Lagerung bei 4°C (die Präparationen von Max 27 und Max 46 wurden mit neuen Ejakulaten wiederholt)

Tabelle 31: Motilitätsdaten der Spermien nach 24 h, die für die Präparation der DRMs aus kälteresistenten und kältesensitiven Spermien verwendet wurden (Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen die zugehörigen Gradienten)

Eber	Lagerung bei 16°C:			Lagerung bei 4°C:		
	Motile [%]	Spermien	Progressiv Spermien [%]	Motile [%]	Spermien	Progressiv Spermien [%]
Max 27 (wdh.)		-	-	89		81
Max 27	86		77	83		67
Max 61	93		90	83		74
HP 163	93		92	84		73
HP172	78		65	64		48
Max 25	76		70	65		59
HP 204	91		86	81		69
Max 46	83		78	69		59
Max 46 (wdh.)	-		-	70		62
Max 39	88		73	64		52

4.5.3.2 Sortierung der Eber nach verschiedenen Motilitätskriterien

Um die Eber nach ihrer Toleranz gegenüber der Lagerung bei 4°C zu sortieren, wurden sie nach den verschiedenen durchschnittlichen Motilitäten und progressiven Motilitäten gewichtet (siehe Tabellen im Anhang). Dabei wurden auch die Motilitätswerte am Gewinnungstag des Ejakulats mit einbezogen. Insgesamt entstand dabei die in **Tabelle 32** dargestellte Reihenfolge:

Tabelle 32: Die kälteresistenten und kältesensitiven Eberspermien wurden nach ihren Motilitätsdifferenzen zwischen 16°C- und 4°C-Lagerung gewichtet (je kleiner der Wichtungswert, desto geringer die Motilitätsdifferenz). Gezeigt ist der Gesamtdurchschnitt aller Wichtungen sowie die Differenzen der Motilität und der progressiven Motilität (Gesamtdurchschnitt = 2x 24h- + 48h- + 72h- Wert), roter Wert in Klammern: Wurde nicht in die Berechnung mit einbezogen, da bei diesen Proben insgesamt die Motilität gering war (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28)

Ebername	24h Durchschnitt Wichtung	48h Durchschnitt Wichtung	72h Durchschnitt Wichtung	Gesamtdurchschnitt Wichtung	Gesamtdurchschnitt der Motilitätsdifferenz	Gesamtdurchschnitt der progressiven Motilitätsdifferenz
Max 27	1	1	2	1,3	3,6	7,7
Max 61	2,5	2	3,5	2,6	9,2	11,6
HP 163	3	4	(1)	3,3	11,3	12,1
HP172	5	3,5	3,5	4,3	11,2	15,3
Max 25	4,5	4,5	6	4,9	12,3	16,3
HP204	5	6,5	6,5	5,8	13,3	17,0
Max 46	7,5	6,5	5,5	6,8	14,9	18,9
Max 39	7,5	8	8	7,8	22,9	25,5

Nach dieser Sortierung wurden zwei Eber (Max 27 und Max 61) als „kälteresistent“ eingestuft: Ihre Motilitätsdifferenz zwischen den beiden Lagerungstemperaturen betrug weniger als 10%. Die Differenz der progressiven Motilitäten war bei einem dieser beiden

Eber ebenfalls geringer als 10%, bei dem anderen mit 11,6% nur etwas höher. Die beiden Eber (Max 46 und Max 39), die die größten Unterschiede zwischen beiden Lagerungstemperaturen zeigten, wurden als „kältesensitiv“ eingestuft. Die anderen vier Eber ordneten sich im Mittelfeld ein, sie zeigten häufig ein recht wechselhaftes Verhalten zwischen den einzelnen Ejakulaten, was auch an der zumeist recht großen Standardabweichung der Werte deutlich wird (**Abbildung 27** und **Abbildung 28**).

4.5.3.3 Lipid- und Proteinverhältnisse

Bei den Lipid- und Proteinbestimmungen (**Tabelle 33** und **Tabelle 34**) ließen sich keine Unterschiede zwischen den kältesensitiven und kälteresistenten Eberspermien oder den daraus isolierten DRMs finden. Die Variation innerhalb der Ejakulate eines Ebers war genauso groß wie zwischen den Ejakulaten der verschiedenen Eber.

Tabelle 33: Cholesterol zu Phospholipid- sowie Lipid zu Proteinverhältnisse in den Kontrollproben von den auf Kälteempfindlichkeit untersuchten Spermien (16°C-Proben), Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (Std)

16°C-Proben	Gewaschene Spermien		Überstand	
Eber	CHO/PL-Verhältnis [nmol/nmol]	Gesamtlipid / Protein [nmol/µg]	CHO/PL-Verhältnis [nmol/nmol]	Gesamtlipid / Protein [nmol/µg]
Max 27	0,34	0,17	0,32	0,50
Max 61	0,27	0,19	0,17	0,76
HP 163	0,27	0,14	0,16	0,79
HP172	0,33	0,16	0,35	0,28
Max 25	0,25	0,21	0,31	0,64
HP 204	0,20	0,32	0,15	0,47
Max 46	0,37	0,19	0,33	0,50
Max 39	0,28	nd	0,31	0,59
MW ± Std	0,29 ± 0,05	0,20 ± 0,06	0,26 ± 0,09	0,57 ± 0,17

Tabelle 34: Cholesterol zu Phospholipid- sowie Lipid zu Proteinverhältnisse in den isolierten DRM-Banden der Dichtegradienten von den auf Kälteempfindlichkeit untersuchten Spermien (16°C-Proben), Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (Std)

16°C-Proben	Bande 1 CHO/PL- Verhältnis [nmol/nmol]	Gesamtlipid / Protein [nmol/mg]	Bande 2 CHO/PL- Verhältnis [nmol/nmol]	Gesamtlipid / Protein [nmol/mg]	Bande 3 CHO/PL- Verhältnis [nmol/nmol]	Gesamtlipid / Protein [nmol/mg]
Eber						
Max 27	0,27	3,21	nd	nd	0,26	1,77
Max 61	0,67	1,25	0,42	3,24	0,37	2,63
HP 163	nd	0,85	0,28	2,33	0,48	1,27
HP172	0,27	3,57	0,21	2,64	nd	nd
Max 25	0,28	3,64	0,27	2,47	nd	nd
HP 204	0,51	2,66	0,50	1,81	0,43	2,10
Max 46	0,28	3,09	0,25	2,21	0,29	1,55
Max 39	0,38	4,04	0,48	2,38	0,32	1,89
MW ± Std	0,38 ± 0,16	3,07 ± 0,91	0,34 ± 0,12	2,44 ± 0,44	0,36 ± 0,08	1,87 ± 0,47

4.5.3.4 ³¹P-NMR-Untersuchungen

Um zu untersuchen, ob sich in der Zusammensetzung der Lipidklassen zwischen den kälteresistenten und kältesensitiven Spermien Unterschiede finden lassen, wurde sie mittels ³¹P-NMR analysiert. Die Daten der NMR-Untersuchungen befinden sich in Tabelle 35 bis Tabelle 41. Die Anteile der unterschiedlichen Lipide unterschieden sich nicht zwischen kälteresistenten und kältesensitiven Eberspermien. Dies gilt ebenso für ihre Überstände (Tabelle 35).

Tabelle 35: Anteile der verschiedenen Lipidklassen am Gesamtlipidgehalt in den gewaschenen Spermien und Überständen der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien berechnet nach der quantitativen Auswertung der ³¹P-NMR-Analysen (alle Angaben in %), in allen Proben wurde kein PI detektiert, Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (Std)

Probe (16°C-Werte)	Spermien			Überstand		
	GPE	SM	GPC	GPE	SM	GPC
Max 27	22	25	53	10	34	55
Max 61	27	21	52	12	23	65
HP 163	25	18	53	23	23	54
HP 172	23	20	56	21	21	57
Max 25	25	22	53	20	25	55
HP 204	18	24	58	27	15	58
Max 46	19	26	56	24	21	55
Max 39	45	6	49	12	34	54
MW ± Std	25 ± 8	20 ± 6	54 ± 3	19 ± 6	25 ± 7	57 ± 4

Ebenso ließen sich bei den Spermien und Überständen keine Unterschiede zwischen den verschiedenen GPCs und GPEs beim Vergleich der kältesensitiven und kälteresistenten Spermien feststellen (Tabelle 36 und Tabelle 37).

Tabelle 36: Verhältnisse der verschiedenen Bindungen der Fettsäurereste bei den Phosphatidylcholinen (GPC) in % bezogen auf den Gesamt-GPC-Gehalt in den gewaschenen Spermien und Überständen der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien berechnet nach der quantitativen Auswertung der ³¹P-NMR-Analysen, Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (Std)

Probe	Spermien			Überstand		
(16°C-Werte)	etherGPC	diacylGPC	plasmGPC	etherGPC	diacylGPC	plasmGPC
Max 27	60	15	25	48	3	49
Max 61	67	8	25	56	17	26
HP 163	57	7	37	56	8	36
HP 172	37	38	26	41	18	41
Max 25	50	21	29	55	7	38
Max 204	41	17	42	60	16	24
Max 46	45	28	26	57	6	37
Max 39	62	5	33	54	0	46
MW ± Std	52 ± 11	17 ± 11	30 ± 6	53 ± 6	9 ± 7	37 ± 9

Tabelle 37: Verhältnisse der verschiedenen Bindungen der Fettsäurereste bei den Phosphatidylethanolaminen (GPE) in % bezogen auf den Gesamt-GPE-Gehalt in den gewaschenen Spermien und Überständen der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien berechnet nach der quantitativen Auswertung der ³¹P-NMR-Analysen, Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (Std)

Probe	Spermien		Überstand	
(16°C-Werte)	etherGPE	plasmGPE	etherGPE	plasmGPE
Max 27	79	21	63	37
Max 61	64	36	62	38
HP 163	56	44	54	46
HP 172	62	38	63	37
Max 25	59	41	58	42
Max 204	55	45	63	37
Max 46	41	59	83	17
Max 39	62	38	69	31
MW ± Std	60 ± 11	40 ± 11	64 ± 9	36 ± 9

Für die DRM-Banden ließen sich folgende Unterschiede zwischen den kältesensitiven und kälteresistenten Spermien feststellen: Bei den Banden der kältesensitiven Spermien fand sich eine leichte Erhöhung des GPE-Gehalts in der Bande a. Bei der Bande b dieser Proben war der GPE-Gehalt etwas niedriger im Vergleich zu den kälteresistenten Spermien. Der SM-Gehalt verhielt sich in diesen beiden Banden gegenläufig dazu (**Tabelle 38**).

Tabelle 38: Anteile der verschiedenen Lipidklassen am Gesamtlipidgehalt in den DRM-Banden der kälteresisitenen und kältesensitiven Spermien berechnet nach der quantitativen Auswertung der ³¹P-NMR-Analysen (alle Angaben in %), Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (Std)

Probe (16°C-Werte)	Bande a				Bande b				Bande c			
	GPE	SM	GPC	PI	GPE	SM	GPC	PI	GPE	SM	GPC	PI
Max 27	31	22	34	14	6	43	44	7	19	24	53	4
Max 61	nd	nd	nd	nd	14	33	42	11	21	43	36	0
HP 163	35	14	50	-	19	40	41	-	29	27	44	0
HP 172	21	31	42	6	25	22	53	0	nd	nd	nd	nd
Max 25	26	33	41	0	35	15	50	0	nd	nd	nd	nd
HP 204	37	22	41	-	37	22	41	-	31	31	39	0
Max 46	4	44	48	5	26	7	41	26	22	20	58	0
Max 39	24	30	33	13	30	29	41	0	32	30	38	0
MW ± Std	25 ± 11	28 ± 9	41 ± 6	5 ± 6	24 ± 11	26 ± 12	44 ± 5	5 ± 9	26 ± 6	29 ± 8	45 ± 9	1 ± 2

Der stärkste Unterschied ließ sich für die Zusammensetzung der verschiedenen GPCs in allen Banden finden: So hatten die kälteresisitenen Eber im Vergleich zu den kältesensitiven Ebern einen eher geringen Anteil an diacylGPC und einen höheren Anteil an plasmGPC.

Tabelle 39: Verhältnisse der verschiedenen Glycerophosphatidylcholinen (GPC) in % bezogen auf den Gesamt-GPC-Gehalt in den DRM-Banden der kälteresisitenen und kältesensitiven Spermien berechnet nach der quantitativen Auswertung der ³¹P-NMR-Analysen, Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (Std)

Probe (16°C-Werte)	Bande a			Bande b			Bande c		
	etherGPC	diacylGPC	plasmGPC	etherGPC	diacylGPC	plasmGPC	etherGPC	diacylGPC	plasmGPC
Max 27	52	19	29	32	18	50	52	0	48
Max 61	-	-	-	54	23	23	69	0	31
HP 163	67	0	33	49	18	33	62	0	38
HP 172	44	33	24	40	38	22	-	-	-
Max 25	59	7	33	56	2	42	-	-	-
Max 204	100	0	0	86	3	11	100	0	0
Max 46	24	62	14	32	39	29	45	25	30
Max 39	58	34	8	51	21	28	67	0	33
MW ± Std	58 ± 23	22 ± 23	20 ± 13	50 ± 17	20 ± 14	30 ± 12	66 ± 19	4 ± 10	30 ± 16

Zur besseren Übersicht über die Unterschiede der verschiedenen GPCs in den DRM-Banden wurden die Mittelwerte aus den drei Banden gebildet, da sich die drei Banden zumeist auch stark in ihren Einzelwerten ähnelten, und außerdem die Quotienten der verschiedenen GPCs berechnet. Diese Werte sind in **Tabelle 40** dargestellt: Bei den Banden der kälteresisitenen Spermien sieht man deutlich einen geringeren Wert des diacyl-/plasmGPC-Verhältnisses.

Tabelle 40: prozentualer Anteil der verschiedenen GPCs am Gesamt-GPC-Gehalt und GPC-Verhältnisse, Angabe der Mittelwerte aus den drei DRM-Banden der 16°C-Gradienten der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien (Einzelwerte der drei Banden siehe Tabelle 39)

Mittelwerte aus allen 16°C-Banden	etherGPC [%] - bezogen auf den Gesamt-GPC-Gehalt -	diacylGPC [%]	plasmGPC [%]	diacyl-/etherGPC	ether-/plasmGPC	diacyl-/plasmGPC
Max 27	45	12	42	0,31	1,08	0,30
Max 61	62	12	27	0,22	2,30	0,44
HP 163	60	6	34	0,12	1,73	0,17
HP172	42	35	23	0,85	1,83	1,55
Max 25	57	5	38	0,08	1,53	0,13
HP204	95	1	4	0,01	26,36	0,28
Max 46	33	42	25	1,48	1,35	1,70
Max 39	58	18	23	0,33	2,50	0,78

Bei den verschiedenen GPEs ließen sich für die DRM-Banden keine Unterschiede zwischen den kältesensitiven und kälteresistenten Spermien finden (Tabelle 41).

Tabelle 41: Verhältnisse der verschiedenen Glycerophosphatidylethanolaminen (GPE) in % bezogen auf den Gesamt-GPE-Gehalt in den DRM-Banden der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien berechnet nach der quantitativen Auswertung der ³¹P-NMR-Analysen, Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) ± Standardabweichungen (Std)

Probe (16°C-Werte)	Bande a		Bande b		Bande c	
	etherGPE	plasmGPE	etherGPE	plasmGPE	etherGPE	plasmGPE
Max 27	23	78	47	53	66	34
Max 61	nd	nd	67	33	67	33
HP 163	72	28	66	34	nd	nd
HP 172	52	48	53	47	nd	nd
Max 25	78	22	68	32	78	22
Max 204	-	-	74	27	69	32
Max 46	65	35	59	41	-	-
Max 39	59	41	63	38	54	46
MW ± Std	58 ± 20	42 ± 20	62 ± 9	38 ± 9	67 ± 9	33 ± 9

4.5.3.5 MALDI-TOF-MS

Um die bei der ³¹P-NMR-Analyse gefundenen Unterschiede der GPCs zwischen den DRMS der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien noch genauer untersuchen zu können, sollten die einzelnen GPCs mit ihren zugehörigen Fettsäureresten sowie Alkyl- und Alkenylresten mittels MALDI-TOF MS analysiert werden. Dabei wurden die Proben für die MALDI-TOF MS zuvor mittels einer Dünnschichtchromatographie getrennt. Die dabei entstehenden einzelnen Banden wurden abgeschabt und aus dem Kieselgel der TLC-Platte extrahiert. Neben der Trennung in die einzelnen Lipidklassen, sodass explizit die GPCs

untersucht werden konnten, wurde dadurch eine recht gute Trennung vom störenden Triton X-100 erreicht (siehe Einleitung, Abschnitt 2.6).

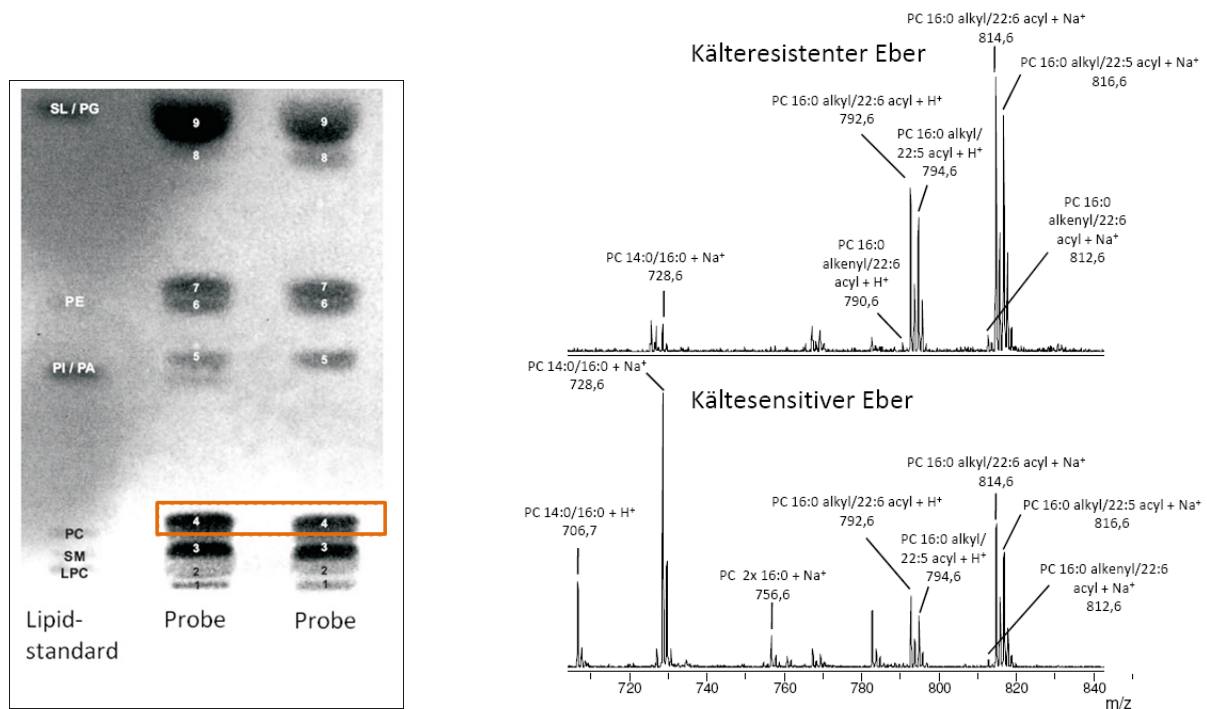


Abbildung 32: Beispielhafte Darstellung einer Dünnschichtchromatographie und zweier MALDI-TOF Massenspektren (positive Ionen, DHB) der DRMs aus kälteresistenten und kältesensitiven Eberspermien. Für die Massenspektrometrie wurde die isolierte GPC-Bande aus der Dünnschichtchromatographie (Bande 4 in der Abbildung) verwendet. Bei den MALDI-Spektren sind zwei extreme Beispiele der analysierten DRM-Banden eines kälteresistenten und eines kältesensitiven Ebers dargestellt, um die Unterschiede in den Peakintensitäten zu verdeutlichen.

In **Abbildung 32** ist beispielhaft eine der Dünnschichtchromatographien dargestellt, ebenso wie zwei ausgewählte Massenspektren der DRMs aus kälteresistenten und kältesensitiven Eberspermien, bei denen die GPC-Bande der Dünnschichtchromatographie untersucht wurde.

Für eine semiquantitative Auswertung wurden in den Massenspektren die Peakintensitäten der folgenden Peaks ermittelt:

Tabelle 42: m/z-Werte der Massenspektren und zugehörige Lipide der untersuchten GPCs und LPCs

m/z	zugehöriges Lipid
546,3	LPC 18:0 + Na ⁺
568,3	LPC 22:6 + H ⁺
590,3	LPC 22:6 + Na ⁺
596,3	FormylLPC 22:6 + H ⁺
618,3	FormylLPC 22:6 + Na ⁺
570,3	LPC 22:5 + H ⁺
592,3	LPC 22:5 + Na ⁺
598,3	FormylLPC 22:5 + H ⁺
620,3	FormylLPC 22:5 + Na ⁺
706,6	GPC 14:0/16:0 + H ⁺
728,6	GPC 14:0/16:0 + Na ⁺
756,6	GPC 2x 16:0 + Na ⁺
790,5	GPC 16:0 alkenyl/22:6 acyl + H ⁺
812,5	GPC 16:0 alkenyl/22:6 acyl + Na ⁺
792,5	GPC 16:0 alkyl/22:6 acyl + H ⁺ oder GPC 16:0 alkenyl/22:5 acyl + H ⁺
794,5	GPC 16:0 alkyl/22:5 acyl + H ⁺
814,5	GPC 16:0 alkyl/22:6 acyl + Na ⁺ oder GPC 16:0 alkenyl/22:5 acyl + Na ⁺
816,5	GPC 16:0 alkyl/22:5 acyl + Na ⁺

Wie in **Tabelle 42** ersichtlich, werden bei der Ionisierung der MALDI-TOF MS-Analyse H⁺- und Na⁺-Addukte gebildet. Dabei resultiert die Bildung der H⁺-Addukte aus der sauren DHB-Matrix und die Bildung der Na⁺-Addukte wird durch das stets in biologischen Proben vorhandene Na⁺ verursacht.

Anhand der Intensitäten dieser Lipidpeaks wurde dann für jedes Spektrum der Anteil von

a) Gesättigten GPCs

b) Plasmalogenen (inklusive FormylLPCs)

c) LPCs (inklusive FormylLPCs)
und LPCs)

(bezogen auf den Gesamtgehalt an GPCs

sowie

d) FormylLPCs

(bezogen auf die Plasmalogene)

berechnet. Es wurden auch die Intensitäten der zugehörigen Abbauprodukte (Lysolipide) ermittelt, da vor allem bei den Plasmalogenen ein recht großer Anteil bereits zu Lysolipiden (Formyllysolipiden) abgebaut war. Dies wurde sicherlich durch die vorherige Trennung auf der TLC-Platte durch die sauren Gruppen der TLC-Beschichtung verursacht, wie bereits bei der Analyse von Bullenspermien nachgewiesen werden konnte [96].

Tabelle 43: Semiquantitative Auswertung der TLC-MALDI der 16°C-Proben (jeweils Banden a-c der DRMs vereinigt) – Angabe der prozentualen Werte der gesättigten GPCs, Plasmalogenen und LPCs (bezogen auf den Gesamtgehalt an GPCs und LPCs) sowie des FormylLPCs (bezogen auf den Gesamtgehalt an Plasmalogenen und FormylLPC), die Berechnung erfolgte über die Peakintensitäten der Massenspektren

Eberbezeichnung	Gesättigte GPCs [%]	Plasmalogene [%]	LPCs [%]	FormylLPC [%]
	- bezogen auf Gesamtgehalt an GPC und LPC -			- bezogen auf Gesamtgehalt an FormylLPC + Plasmalogen -
Max 27	9	11	4	18
Max 61	4	10	6	48
HP 204	9	16	8	48
HP 163	14	17	9	48
Max 46	32	16	7	25
Max 39	23	3	1	15

Der Anteil an gesättigten GPCs bei den DRMs der kälteresistenten Eberspermien war deutlich geringer, als bei den DRMs der kältesensitiven Eberspermien (**Tabelle 43**). Bei den Plasmalogenen (plasmGPC) ließ sich kein eindeutiger Unterschied im Gehalt in den DRMs zwischen den kälteresistenten und kältesensitiven Spermien finden. Ebenso gab es zwischen den Gruppen auch keinen Unterschied im Gehalt an Lipidabbauprodukten (LPCs und FormylLPCs).

4.5.3.6 SDS-PAGE der DRMS aus kälteresistenten und kältesensitiven Eberspermien

Mittels SDS-PAGE sollte untersucht werden, ob es Unterschiede der Proteinzusammensetzung zwischen den DRMS aus kälteresistenten und kältesensitiven Eberspermien gab. **Abbildung 33** zeigt das SDS-Gel der DRM-Proben von Max 27 beispielhaft für alle anderen SDS-Gele der anderen Eber. Mittels der eindimensionalen SDS-PAGE konnte kein Unterschied in den Bandenmustern zwischen den verschiedenen Ebern in Bezug auf die Kälteverträglichkeit ihrer Spermien festgestellt werden. Auch die Lagerungstemperatur veränderte das Bandenmuster nicht. Die Bande c hatte allerdings stets

ein von Bande a und Bande b abweichendes Muster und auch die Bodenkontrolle zeigte ein davon abweichendes Muster der Proteinbanden.

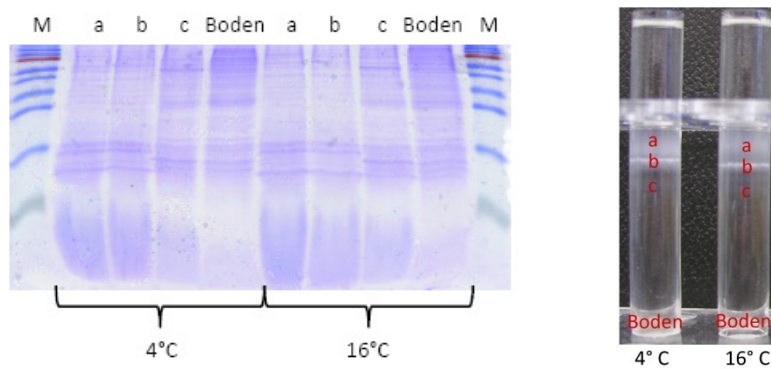


Abbildung 33: SDS-PAGE der Gradientenproben von Eber Max 27, im Gel sind die Auftrennungen der Banden a-c sowie der Bodenfraktion von den Gradienten der 4°C- und 16°C-Proben dargestellt, rechts sind die zugehörigen Gradienten mit den entsprechenden Fraktionen gezeigt

5. Diskussion

5.1 Bedeutung der DRM-Analyse für die Untersuchung von Membrandomänen in Säugerspermien

Bei den getesteten Detergenzien wurde für die Präparation von DRMs aus Eberspermien Triton X-100 ausgewählt. Wie die Untersuchungsergebnisse zeigten, ist dieses Detergenz hierfür aus folgenden Gründen besonders geeignet: Nach der Behandlung mit Triton X-100 befand sich ein Großteil der Spermienlipide im Überstand und es war auch in den späteren Banden ausreichend Lipid und Protein für weitere Lipid- und Proteinanalysen vorhanden. Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen fiel auf, dass Triton X-100 zwar einen Großteil der Plasmamembran der Spermien ablöste, die Kernmembran aber intakt blieb. Damit wurde genau die Membran abgelöst, die im Fokus der Untersuchungen stand. Außerdem waren im Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation scharf abgetrennte Banden sichtbar, wie sie in der Literatur beschrieben werden [81, 102]. Ebenso entsprach die Dichte, bei der diese Banden auftraten, den Angaben der Literatur. Bei den dort beschriebenen diskreten Gradienten befand sich die opaleszente Bande am Übergang zwischen 5% und 35% (w/v) Saccharose. Die Banden dieser Untersuchungen lagen im kontinuierlichen Gradienten bei einer Dichte von etwa $1,13 \text{ g/cm}^3$, was einer Saccharosekonzentration von etwa 34% (w/v) entspricht. Eine deutlich sichtbare Bande entstand ansonsten nur bei Anwendung des ionischen Detergenz Natriumcholat. Allerdings ließ sich ausschließlich für die Banden, die mit Triton X-100 erzeugt wurden, eine Anreicherung von PI sowie SM und zu einem geringeren Anteil auch GPE im Verhältnis zum GPC finden [43]. Die Anreicherung mit SM wird Rafts als Eigenschaft zugeschrieben [107], ebenso wie sich der erhöhte Gehalt an PI möglicherweise aus dem erhöhten Gehalt an Proteinen mit GPI-Anker ergibt [66]. Der Cholesterolgehalt war in den ersten mit Triton X-100 isolierten Banden, die für die Auswahl des geeigneten Detergenz durchgeführt wurden, ebenfalls leicht erhöht (**Tabelle 12**), d. h. es ließ sich relativ mehr Cholesterol aus dem eingesetzten Überstand als Phospholipid in den Banden finden. Im Verlauf des Projektes konnte dies bei den weiteren Untersuchungen der verschiedenen Spermien allerdings nicht bestätigt werden (**Tabelle 17**). Auch der C/P-Wert der DRM-Banden lag im Bereich des C/P-Wertes der Gesamtspermien (**Tabelle 14** und **Tabelle 16**). In der Literatur findet man dazu ebenfalls widersprüchliche Angaben. So beschreiben Botto *et al.* [8] eine Erhöhung des Cholesterols in den DRM-Banden aus Eberspermien gegenüber den anderen Bereichen des Dichtegradienten, Girouard *et al.* fanden

eine Erniedrigung des Cholesterolgehalts in DRMs aus Bullenspermien gegenüber den Triton-löslichen Fraktionen [33]. Vergleicht man allerdings bei den eigenen Untersuchungen den C/P-Wert des Überstandes, d. h. die mit Triton X-100 und mechanisch abgelösten Spermienmembranen vor der Ultrazentrifugation (inklusive der enthaltenen DRMs), mit dem C/P-Wert der DRM-Banden, so findet man eine Erhöhung dieses Wertes in den DRM-Banden gegenüber den Gesamtmembranen (mit den darin enthaltenen Triton-löslichen Anteilen und den DRMs). Somit scheint das Cholesterol- zu Phospholipidverhältnis in den DRM-Bereichen gegenüber der restlichen Spermienmembran wie erwartet erhöht, was mit den Ergebnissen von Botto *et al.* [8] an Eberspermien übereinstimmt. In den Spermien oder in den inneren Membranen enthaltenes Cholesterol könnte für den unerwartet hohen C/P-Wert der Gesamtspermien sorgen. Eine weitere Ursache für die Unterschiede in den eigenen Untersuchungen könnten die relativ hohen Abweichungen bei den Messwerten sein, denn die Standardabweichung betrug teilweise über 30% der eigentlichen Messwerte.

In den Überständen konnten knapp 80% des gesamten Cholesterols und fast 80% des gesamten Phospholipids der Spermien isoliert werden (**Tabelle 17**). Die Werte der ersten Isolierungen, die für die Tests der einzelnen Detergenzien durchgeführt wurden (**Tabelle 12**), waren mit 50,4% (Cholesterolgehalt im Überstand bezogen auf die Gesamtspermien) bzw. 68,9% (Phospholipidgehalt im Überstand) geringer. Diese Diskrepanz liegt sicherlich an der recht großen Streuung dieser Werte. Eine rechnerische Abschätzung der Oberflächenanteile der einzelnen Membranen in Spermienzellen ergab einen Anteil der Plasmamembran und äußerer Akrosomenmembran am Gesamtmembrangehalt der Spermien von etwa 70%. Vermutlich werden diese durch die Detergenzinkubation und mechanische Behandlung im Überstand isoliert. Dieser Wert stimmt im Rahmen der möglichen Messgenauigkeit relativ gut mit den Messwerten überein.

Auch wenn es sich bei DRMs möglicherweise um nicht-native Aggregate von speziellen Domänen handelt [109], scheint die Methode der DRM-Isolierung geeignet, um sich der lateralen Inhomogenität in Spermien anzunähern. Man sollte sich bei ihrer Verwendung allerdings darüber im Klaren sein, dass man die erhaltenen Ergebnisse nicht mit Rafts, d. h. mit in unterschiedlichen räumlichen und zeitlichen Dimensionen *in vivo* existenten Strukturen, gleichsetzen kann. Es sind stets weitere Untersuchungsmethoden nötig, um die Existenz und Zusammensetzung von Rafts zu verifizieren. Bereits Morris *et al.* beschrieben, dass eine Isolierung von DRMs notwendig ist, um die Raftzusammensetzung zu klären, da dies mit mikroskopischen Methoden nicht möglich ist. Anschließend muss in weiteren

Untersuchungen geklärt werden, ob die DRM-Komponenten gemeinsam in Rafts auftreten [73]. Edidin *et al.* stellten fest, dass isolierte DRMs aus Liposomen die gleiche Zusammensetzung hatten, wie die L_o -Domänen der Liposomen [21].

Sicherlich gibt es, wie in der Literatur für andere Zellen beschrieben [91], auch bei Spermien unterschiedliche Arten von Membrandomänen, die sich in ihrer Lipid- und Proteinkomposition sowie in ihrer zeitlichen Stabilität unterscheiden. Bei Mäusespermien konnten bereits drei Arten von DRMs beschrieben werden [4], wobei eine detergenzfreie Präparation angewendet wurde. Die eigenen Ergebnisse, bei denen häufig mehrere Banden bei unterschiedlichen (wenn auch nah beieinanderliegenden) Dichten auftraten, lassen ebenfalls vermuten, dass auch bei Eberspermien verschiedene Arten von DRMs auftreten, die durch das Vorhandensein unterschiedlicher Membrandomänen verursacht werden. Dass diese Bandenmuster nicht immer exakt die gleiche Verteilung zeigten, kann auf individuelle Unterschiede deuten. Wahrscheinlicher scheint der Autorin, dass diese Unterschiede auf Inhomogenitäten zwischen den Gradienten zurückzuführen sind, die möglicherweise trotz vorsichtiger Erstellung der Gradienten mit einem Gradientengießler auftraten. Mögliche Unterschiede in der Lipidzusammensetzung dieser verschiedenen Banden konnten mit den angewendeten Methoden nicht festgestellt werden. Bei den Proteinuntersuchungen mittels SDS-PAGE waren die Intensitäten der einzelnen Proteinbanden der untersten DRM-Bande des Gradienten häufig etwas anders als bei den weiter oben liegenden DRM-Banden. Dies deutet auf eine leicht variierte Proteinzusammensetzung. Zurzeit wird eine zweidimensionale Gelelektrophorese am Institut etabliert. Eine zukünftige Untersuchung von einzelnen DRM-Banden mittels dieser Methode könnte hierbei weitere Aufschlüsse geben. Die in ihren Intensitäten variablen Spots könnten anschließend mittels Trypsinverdau und Massenspektrometrie spezifischen Proteinen zugeordnet werden. Vermutlich ist das Spektrum an Membrandomänen in Eberspermien allerdings zu divers, um mittels DRM-Isolierungen genaue Domänen-Subtypen zu definieren.

Bei den Lebenszeitmessungen an Eberspermien [98] wurde zunächst erwartet, zwei unterschiedliche Lebenszeiten für L_d - und L_o -Domänen dieser Zellen zu finden, so wie dies in GUVs nachgewiesen werden kann [109]. Ein solches Ergebnis konnte jedoch nicht erhalten werden. Vermutlich liegen mögliche verschiedene Lebenszeitwerte so dicht beieinander, dass sie im Spektrum nicht voneinander getrennt werden konnten. Auch in *Giant plasma membrane vesicles* (GPMVs) und anderen lebenden Zellen lässt sich nur eine breite Verteilung dieser Werte finden. Auch dieses Ergebnis lässt eine Vielfalt an Membrandomänen

in lebenden Zellen vermuten [109]. Ebenso fanden Nikolaus *et al.* in GPMVs deutlich kleinere Lebenszeitenunterschiede gegenüber GUVs mit Lipidmischungen, die für die Bildung von Membrandomänen sorgen [79].

Eine wichtige Frage bleibt, warum in den Gradienten trotz vorhandener Lipide und Proteine teilweise keine sichtbaren Banden entstehen. Möglicherweise ist dies auf die Größe der sich bildenden Micellen zurückzuführen. Bei den recht großen Aggregaten, die bei der DRM-Isolierung entstehen, wird das Licht anders gestreut als bei kleineren Micellen aus Einzellipiden [97]. Vermutlich liegen in den DRMs sogar noch Bilayerstrukturen vor, die durch das zugesetzte Detergenz nicht zerstört werden [68]. Insofern sollten nur die durch eine opaleszente Trübung sichtbaren Banden als DRMs isoliert werden.

Die Anwendung der Methode der DRM-Isolierung auf weitere Tierarten würde sich vermutlich recht schwierig gestalten. Die Lipidmengen, die für die anschließenden Analysen nötig sind, befanden sich schon bei den Eberspermien häufig nur knapp oberhalb der unteren Grenze der Bestimmbarkeit. Sicherlich wäre eine Analyse von gepoolten Proben mehrerer Individuen möglich, wie in dieser Studie auch bei den Nebenhodenspermien geschehen. Allerdings erscheint dies vor allem für den Zoo- und Wildtierbereich, bei dem zumeist nur eine geringe Anzahl an Proben verfügbar ist, nicht praktikabel. Alternativen für zukünftige Untersuchungen stellen sicherlich die in der Einleitung beschriebenen mikroskopischen Methoden dar, mit denen inzwischen Untersuchungen an Einzelzellen ebenso wie Einzelmoleküluntersuchungen möglich werden. Bei der Untersuchung lebender Spermien stellt sich dabei das Problem, dass sich die gesunden Zellen schnell fortbewegen und so das Mikroskopieren erschwert ist. Eine chemische Immobilisierung mit Hemmstoffen würde allerdings die Gefahr bergen, Zellprozesse zu stören. Während der Vorversuche zu den Lebenszeit-Messungen wurde eine Methode entwickelt, bei der die Spermien durch Einbettung in ein Agarosegel am Schwimmen gehindert werden und so immobilisiert, aber lebend, für die Mikroskopie zur Verfügung stehen (eigene unveröffentlichte Ergebnisse).

Auch wenn zwischen den Spermien der verschiedenen Spezies Unterschiede in der Lipidzusammensetzung bestehen [27], sind allgemeine Funktionsprinzipien sicherlich ähnlich; so können dann, ausgehend von den DRM-Untersuchungen an Spermien von Nutztieren, weiterführende mikroskopische Untersuchungen an Spermien von Zoo- und Wildtieren, mit einem Fokus auf bedrohte Tierarten, durchgeführt werden. Die dabei gewonnen Erkenntnisse könnten dann dazu beitragen, die Vorgänge bei der natürlichen

Reproduktion besser zu verstehen, um anschließend künstliche Reproduktionstechniken zu verbessern. Denn diese sind heute ein wichtiger Bestandteil von Arterhaltungsprojekten.

5.2 Veränderungen der DRMs während der Reifung im Nebenhoden und durch den Kontakt mit Seminalplasma

Die Membranen von Spermien verändern sich stark während der Maturation und Kapazitation, obwohl keine aktive Synthese von Proteinen in ihnen stattfinden kann. Zunächst wurde auch vermutet, dass Spermien nicht zur aktiven Lipidsynthese fähig sind [131]. Neuere Ergebnisse zeigen allerdings, dass Spermien zumindest aktiv Lipide synthetisieren können [122]. Durch Modellierung ihrer Raftdomänen besteht für die transkriptionell inaktiven Spermien [36] eine Möglichkeit, auf die unterschiedlichen Anforderungen der verschiedenen Umgebungen und Funktionen dieser Zellen auf ihrem Weg vom Hoden bis zur Eizelle zu reagieren. So können Enzyme durch den Wechsel in eine andere Umgebung aktiviert werden oder unterschiedliche Reaktionspartner durch die Zusammenlagerung unterschiedlicher Raftdomänen zueinander finden [47]. Eine weitere Möglichkeit der Reaktion auf neue Anforderungen an die Zelle besteht auch in Änderungen der Lipidzusammensetzung dieser Domänen, um eine Fusion der Membranen mit anderen Membranen zu ermöglichen, wie dies bei der Akrosomenreaktion und der Fusion mit der Eizellmembran erforderlich ist. Aus diesem Grunde wurden Veränderungen der DRM-Zusammensetzung bei Spermien unterschiedlicher Reifestadien erwartet.

Bei testikulären Spermien und Nebenhodenspermien aus dem Caput ist keine Kapazitation möglich. Es müssen also Umordnungen im Nebenhoden stattfinden, die die Spermien „kapazitationsbereit“ machen [11]. Bereits die Epididymosomen des Nebenhodens haben einen hohen Anteil an Cholesterol und SM. Dies lässt Raftstrukturen in ihnen vermuten [35]. In den Gradienten aus Nebenhodenspermien war bei den Caput- und Corpusspermien nur im obersten Gradientenbereich eine ganz schwache Trübung sichtbar. Bei den Spermien aus der Cauda traten dann zwei deutlich sichtbare Banden auf, die eine höhere Dichte besaßen als die Trübung der Gradienten von den Spermien aus den oberen Nebenhodenabschnitten. Die sichtbaren Banden der Ejakulatspermien traten bei der höchsten Dichte auf. Schon diese reproduzierbaren, sichtbaren Unterschiede lassen Veränderungen der DRMs und damit der Membraneigenschaften vermuten. Zusammen mit dem Postulat raftartiger Strukturen in Epididymosomen scheint eine Übertragung dieser Membrandomänen von diesen Vesikeln auf

die Spermien während der Nebenhodenpassage wahrscheinlich. Der C/P-Wert nahm in den Ejakulatspermien gegenüber den Nebenhodenspermien in allen Banden zu, in der Bande a war dieser Unterschied zwischen den Ejakulatspermien und den Cauda-Spermien signifikant (**Tabelle 16**). Der Cholesterolgehalt in den DRMs stieg gegenüber dem Phospholipidgehalt somit nach Seminalplasmakontakt. Der Gesamtlipidgehalt der DRMs wiederum sank im Verhältnis zum Proteingehalt nach der Ejakulation. Dies war für alle Banden signifikant. Somit werden im Verlauf der Nebenhodenpassage und beim Seminalplasmakontakt vermutlich Proteine in die DRMs aufgenommen oder Lipide abgegeben. In der Literatur wird eine Abnahme der Lipide der Spermienmembran während der Nebenhodenpassage beschrieben [80] und auch die eigenen Untersuchungen der Gesamtspermien zeigten eher eine abnehmende Tendenz im Verlauf der Reifung im Nebenhoden (**Tabelle 15**). Somit könnte eine Lipidabnahme bei der Reifung im Nebenhoden die Ursache für das sinkende Lipid zu Proteinverhältnis sein. Ein im Rahmen der Messgenauigkeit gleichbleibender Proteingehalt der Spermien der verschiedenen Stadien lässt dies ebenfalls vermuten. Allerdings sind natürliche Umordnungen zwischen der I_o - und I_d -Phase denkbar, sodass man von den Veränderungen der Gesamtspermien nicht direkt auf die Veränderungen in den DRMs schließen kann. Bezogen auf den Lipidgehalt des Überstandes nach der Detergenzbehandlung konnte in den DRM-Banden der Ejakulatspermien insgesamt mehr Lipid isoliert werden als in den DRM-Banden der Cauda-Spermien (**Tabelle 17**). Dies spricht für eine Aufnahme weiterer Proteine in die DRMs durch den Seminalplasmakontakt und lässt außerdem dahingehend spekulieren, dass in den Ejakulatspermien mehr Rafts vorliegen bzw. sich mehr Membranbereiche in der I_o -Phase befinden. Da schon die quantitativen Untersuchungen des Proteingehalts Veränderungen andeuteten, sollte mittels SDS-PAGE untersucht werden, ob sich die Proteinzusammensetzung zwischen DRMs der Nebhodenspermien und von Ejakulatspermien unterscheidet.

In vergleichenden SDS-Gelelektrophoresen wurden in den DRMs der Ejakulatspermien Proteinbanden gefunden, die aufgrund ihrer Größe vermutlich den Spermadhesinen zugeordnet werden können [120]. Die Proteine dieser Familie binden sich an die Oberfläche der Spermienmembran. Im Falle einer Bande konnte mittels Trypsinverdau und anschließender MALDI-TOF MS auch ein Spermadhesin, das AQN-3, aufgrund spezifischer Peptidmassen verifiziert werden. In den DRMs der Nebhodenspermien waren im SDS-Gel keine Proteinbanden mit entsprechender Größe sichtbar. Allerdings ließen sich in den unteren, klaren Bereichen der Dichtegradienten Proteinbanden mit entsprechender Größe finden. Dies passt zu den Angaben der Literatur, da das Vorhandensein von Spermadhesinen im

Nebenhoden bereits beschrieben wurde [118]. Vermutlich assoziieren die Spermadhesine bereits im Nebenhoden an die Spermien, binden sich aber erst bei den Ejakulatspermien an die Membranbereiche, die in den DRMs isoliert werden.

Die Assoziation der Spermadhesine erfolgt möglicherweise auch über die Bindung an Phospholipide [118], für monomeres AQN-3 wird eine Bindung an GPE in Affinitätssäulen beschrieben [19]. Bei den NMR-Untersuchungen der DRMs ließ sich eine Erhöhung des GPE-Gehalts nach Seminalplasmakontakt feststellen. Diese Erhöhung war zwar nicht signifikant, zeigte aber in allen Banden die gleiche Tendenz. Somit wäre denkbar, dass nach der Ejakulation vermehrt GPE-Moleküle in die Membranbereiche wandern, die in DRMs isoliert werden. Die daran assoziierten Spermadhesine könnten dieser Bewegung dann folgen. Da zurzeit rekombinante Spermadhesine hergestellt werden [99], könnten für zukünftige Versuche Antikörper erzeugt werden, um mit Western-Blot-Analysen der DRMs aus den Spermien verschiedener Reifestadien das Vorhandensein dieser Proteine zu überprüfen. Auch eine Fluoreszenzmarkierung der nun vorliegenden Proteine bzw. ihrer Antikörper wäre denkbar, um dann an lebenden Spermien verschiedener Reifestadien die Verteilung der Spermadhesine fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen.

Der Gehalt an SM sank in den DRM-Banden im Laufe der Reifung im Nebenhoden und auch nach Kontakt mit dem Seminalplasma. Er blieb aber stets höher als der SM-Gehalt in den zugehörigen Gesamtspermien. In Verbindung mit dem steigenden GPE-Gehalt könnte dies eher für eine Destabilisierung der DRMs sorgen, da das Verhältnis von SM zu GPE sinkt. Möglicherweise geschieht dies bereits in Vorbereitung auf die Kapazitation und Akrosomenreaktion. Vielleicht sorgen diese Veränderungen später auch im Zusammenhang mit dem dann folgenden Cholesterolentzug während der Kapazitation für die bereits beschriebene Zusammenlagerung der Rafts zu großen Raftdomänen [136]. Die Destabilisierung der DRM-Bereiche der Membran könnte zunächst durch stabilisierende Proteine des Seminalplasmas, die sich schützend auf der Spermienmembran anlagern, ausgeglichen werden. So wird in der Literatur beschrieben, dass sich beispielsweise die Spermadhesine nach der Ejakulation schützend um die Kopfkappe der Spermien legen und so einer vorzeitigen Akrosomenreaktion vorbeugen [118].

In den DRMs konnte außerdem eine Zunahme des PIs im Laufe der Reifung beobachtet werden bzw. PI war nur in den DRM-Banden der Ejakulatspermien zu finden. Eine Ausnahme bildeten dabei nur die Nebenhodenspermien, die für die Inkubationsversuche mit dem

Seminalplasma verwendet wurden. Bei diesen wurden auch in den DRMs der Cauda-Spermien geringe Mengen an PI gefunden. Allerdings wurden bei dieser Probe alle Banden für die NMR-Untersuchung gepoolt, sodass der sehr geringe PI-Anteil eventuell erst durch die höhere Gesamtlipidmenge sichtbar wurde. Auch diese PI-Zunahme würde für eine Zunahme der Proteine in den DRMs nach Kontakt mit Seminalplasma sprechen, denn sie könnte ihre Ursache im verstärkten Auftreten von Proteinen mit GPI-Anker haben.

Die Gesamtspermien wurden außerdem mittels MALDI-TOF MS untersucht. In den Überständen und DRM-Banden war dies aufgrund des störenden Triton X-100 (siehe Einleitung, 2.6) nicht möglich. Bei der Analyse einzelner Lipide mittels MALDI-TOF MS ist zu berücksichtigen, dass verschiedene Lipide bzw. deren Ionen die gleiche Masse besitzen und damit einige Peaks nicht eindeutig einem bestimmten Lipid zugeordnet werden können. So zum Beispiel bei $[\text{GPC } 16:0 \text{ alkyl}/22:6 \text{ acyl} + \text{H}]^+$ und $[\text{GPE } 16:0 \text{ alkenyl}/22:6 \text{ acyl}-\text{H}^+ + 2 \text{ Na}]^+$, die beide einen Peak bei $m/z = 792,5$ erzeugen. Mittels eines Phospholipaseverdaus könnte anhand der daraus gebildeten Abbauprodukte eine genaue Zuordnung erfolgen. Dies war jedoch aus Mangel an Probenmaterial nicht mehr realisierbar. Allerdings wurden für Eberspermien ihre Lipide und vor allem auch deren Abbauprodukte (Lysophospholipide) genau untersucht [58], sodass aus diesen Erfahrungen eine eindeutige Zuordnung mit recht großer Sicherheit möglich wird.

Bei der Untersuchung der Gesamtspermien dominierten in den Massenspektren der Ejakulatspermien GPCs mit langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäureketten, sodass im Gegensatz zu den Nebenhodenspermien weniger Lipide mit kürzeren, stärker gesättigten Ketten gefunden werden konnten. Vermutlich wurden die Lipide mit langkettigen, ungesättigten Fettsäuren aus dem Seminalplasma aufgenommen, obwohl in den Spektren der gelartigen Pellets aus dem Seminalplasma diese Lipide ebenfalls nur in sehr geringen Anteilen zu finden waren. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Lipide durch den Kontakt des Seminalplasmas mit seinen Originalspermien während der Ejakulation bereits in diese übertragen wurden. Trotz rascher Zentrifugation, die noch in der Eberstation erfolgte, konnte ein Kontakt über mehrere Minuten nicht vermieden werden. Diese Zeit könnte möglicherweise bereits für die Übertragung ausgereicht haben. Eine weitere Erklärung wäre die Synthese dieser Lipide durch die Ejakulatspermien, da Spermien einen aktiven Lipidstoffwechsel besitzen [122] und zumindest Humanspermien fähig sind, Etherlipide zu bilden [49]. Ebenfalls ist es denkbar, dass Lipide mit kürzeren, gesättigten Fettsäuren bevorzugt für den Energiestoffwechsel genutzt werden, der im Laufe der Reifung für die

Abnahme des Gesamtlipidgehalts der Spermien sorgt [80]. Durch diese unterschiedlichen Prozesse könnte das Verhältnis zwischen Lipiden mit kürzeren, gesättigten Fettsäuren und Lipiden mit langkettigen, ungesättigten Fettsäuren verschoben werden. Auch die NMR-Daten der Gesamtspermien passen zu diesen MALDI-TOF MS Daten der verschiedenen Reifestadien: Während der Reifung der Spermien und vor allem nach dem Seminalplasmakontakt sank der Gehalt an diacylGPC signifikant und der Gehalt an etherGPC stieg. Bei Eberspermien sind an die diacylGPCs vor allem kürzere, gesättigte Fettsäuren gebunden, während bei etherGPCs häufig eine der beiden gebundenen Fettsäuren langkettiger und ungesättigt ist [58].

Bei den DRM-Banden konnte nur in der untersten Bande (Bande c) eine signifikante Abnahme an diacylGPC nach der Ejakulation beobachtet werden. Dies spricht in dieser DRM-Bande ebenfalls eher für die oben postulierten, destabilisierenden Prozesse der DRMs nach Seminalplasmakontakt, da infolgedessen der relative Gehalt an etherGPC und plasmGPC steigt und sich somit das Verhältnis der Fettsäurereste zu vermehrt ungesättigten Fettsäureresten verschiebt.

Desweiteren ließ sich in den MALDI-TOF Massenspektren der Gesamtspermien im Laufe der Reifung im Nebenhoden bei den SMs eher eine zunehmende Tendenz beobachten, während die ^{31}P -NMR-Ergebnisse eher eine leichte Abnahme der SMs in den reifenden Nebenhodenspermien und vor allem ihren DRMs zeigten. In Kongruenz zu den MALDI-TOF MS Ergebnissen an Gesamtspermien beschrieben Nikolopoulou *et al.* [80] eine Zunahme an SM in den Plasmamembranen von Eberspermien während der Reifung im Nebenhoden. Bei den Ejakulatspermien traten die Peaks SMs in den Massenspektren der eigenen Untersuchungen nicht mehr auf, möglicherweise wurden sie aber durch den hohen Anteil der GPCs unterdrückt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sie ins Seminalplasma abgegeben wurden, denn in den gelartigen Pellets der Seminalplasmaproben konnten mehrere verschiedene SMs gefunden werden.

Bei den MALDI-TOF Massenspektren ließ sich außerdem GPE (GPE 16:0 alkyl/22:5 acyl) detektieren, und zwar bei den Nebenhodenspermien aus dem Caput und der Cauda und bei den Ejakulatspermien. Bei den NMR-Untersuchungen der Gesamtspermien und der Überstände wurde GPE nur in den Nebenhodenspermien der Cauda und in den Ejakulatspermien gefunden. Außerdem stieg der GPE-Gehalt sowohl in den Gesamtspermien als auch in den Überständen nach Kontakt mit dem Seminalplasma signifikant (**Tabelle 18**).

In den Massenspektren konnte eine solche Tendenz nicht beobachtet werden. Der GPE-Gehalt schien bei diesen Spektren eher gleichbleibend. Der bei den NMR-Ergebnissen beobachtete GPE-Anstieg in den Spermien nach Seminalplasmakontakt passt zu den steigenden Tendenzen des GPE in den DRMs nach der Ejakulation. Die Ergebnisse der NMR-Analysen stehen aber im Widerspruch zu den Untersuchungen von Nikolopoulou *et al.* [80], der leicht sinkende GPE-Werte in den isolierten Plasmamembranen aus Nebenhodenspermien während der Reifung im Nebenhoden feststellte. Möglicherweise könnte diese Diskrepanz durch deutliche methodische Unterschiede verursacht worden sein: für die in der Literatur beschriebenen Versuche wurde die Plasmamembran mittels Stickstoff-Kavitation in einer Parr-Bombe präpariert und der Gehalt an unterschiedlichen Phospholipidklassen wurde mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie ermittelt.

Bei den NMR-Untersuchungen wurden in den Nebenhodenspermien außerdem etwa 10% Lysolipide gefunden, in den Ejakulatspermien trat dies nicht auf. Ein besserer Schutz vor Lysolipiden bei Ejakulatspermien wird dem Vorhandensein von Antioxidantien (Vitamin E) im Seminalplasma zugeschrieben [65]. Da jedoch in den MALDI-TOF Massenspektren dieser Nebenhodenspermienproben keine Lysolipide gefunden wurden, handelt es sich möglicherweise um einen präparativen Fehler. Die genaue Ursache konnte bisher nicht geklärt werden, da die Probenaliquots für beide Untersuchungen gemeinsam extrahiert wurden und die Trennung erst am Ende der Lipidextraktion erfolgte. Vergleichende Untersuchungen zum Lysolipidgehalt von Nebenhoden- und Ejakulatspermien des Ebers in anderem Zusammenhang zeigten bisher keine Unterschiede zwischen den Spermien der verschiedenen Reifestadien. Es gab zwar individuelle Unterschiede im Lysolipidgehalt, der Gehalt an Lysolipiden war aber insgesamt mit unter 5% des gesamten GPCs sehr gering (eigene unveröffentlichte Ergebnisse).

Um die Herkunft der auftretenden Veränderungen an den Spermien und vor allem ihren DRMs besser zu verstehen, wurde auch isoliertes Seminalplasma untersucht. Aus dem Seminalplasma ließ sich mittels Ultrazentrifugation ein gelartiges Pellet gewinnen. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte für dieses Pellet vesikelartige Strukturen, die einen Durchmesser von 50 – 200 nm besaßen. Vermutlich handelte es sich daher bei diesen Strukturen um sogenannte Prostasomen, die mit vergleichbaren Größen in der Literatur beschrieben wurden [32, 106]. Auch der C/P-Wert dieser Vesikel war gegenüber dem C/P-Wert des gesamten Seminalplasmas erhöht. Dies könnte auf l_o -Domänen in den Vesikeln deuten. Allerdings ließen sich in einer DRM-Präparation keine sichtbaren Banden in den

Gradienten erzeugen. Ursächlich dafür könnte ein insgesamt zu geringer Lipidgehalt sein, denn die Lipidmengen in den einzelnen Fraktionen des Saccharosedichtegradienten befanden sich an der unteren Detektionsgrenze der verwendeten Methoden. Einzig Proteine, die insgesamt in recht hohem Maße im Seminalplasma auftraten, ließen sich in den untersten vier Fraktion der Dichtegradienten finden. Eine SDS-PAGE zeigte anhand der Bandengrößen, dass es sich dabei vermutlich überwiegend um Proteine der Spermadhesinfamilie handelte. Dies würde den Erwartungen entsprechen, da die Spermadhesine einen Großteil der Seminalplasmaproteine bilden [118].

Mittels ^{31}P -NMR ließ sich beim Seminalplasma in den gelartigen Pellets ein Anteil von 10% PS finden. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich in den gelartigen Pellets auch Membranbestandteile befanden, die sich bei Spermien in der inneren Lamelle befinden. Der Anteil an SM schwankte bei diesen Untersuchungen zwischen den beiden Proben stark. In den massenspektrometrischen Analysen trat hingegen bei beiden Proben im Vergleich zu den Spermien ein recht hoher Anteil verschiedener SMs auf. Dies könnte ebenfalls auf die Existenz von Membrandomänen hindeuten.

Nebenhodenspermien aus der Cauda wurden mit isoliertem Seminalplasma inkubiert, um zu versuchen, den Ejakulationsvorgang zu simulieren. Dabei erhöhte der Zusatz des Seminalplasmas die Motilität der Nebenhodenspermien deutlich, sodass die behandelten Nebenhodenspermien ähnliche Motilitätswerte zeigten wie Ejakulatspermien (70% motile Nebenhodenspermien mit Seminalplasma gegenüber etwa 80% motile Ejakulatspermien). Allerdings besaßen bereits die Dichtegradienten der mit Seminalplasma behandelten Nebenhodenspermen ein Bandenmuster, das sich von dem der Ejakulatspermien unterschied (vgl. **Abbildung 14** und **Abbildung 23**). Auch im Vergleich zu den Gradienten der unbehandelten Nebenhodenspermien gab es im Bandenmuster deutliche Unterschiede. Somit scheinen Veränderungen an den DRMs durch den Kontakt der Nebenhodenspermien mit dem isolierten Seminalplasma stattgefunden zu haben, die aber nicht den Veränderungen während der Ejakulation entsprechen. Dass die drei Banden der Nebenhodenspermien dieses Versuchs (**Abbildung 23**, rechts) dichter beieinanderlagen als bei den übrigen Gradienten der Nebenhodenspermien (**Abbildung 13**), ist vermutlich auf Inhomogenitäten der Gradienten zurückzuführen. Bei den Lipid- und Proteinmengen ließen sich zwischen den mit Seminalplasma behandelten Nebenhodenspermien und denen ohne Behandlung keine Unterschiede feststellen, ebenso in den Anteilen der einzelnen Lipidklassen (**Tabelle 29**). Bei den Nebenhodenspermien mit und ohne Seminalplasmakontakt verhielt sich der Gehalt an

diacylGPC genauso wie zwischen Ejakulat- und Nebenhodenspermien (vgl. **Tabelle 20** und **Tabelle 30**): Nach Seminalplasmakontakt wurde der Gehalt an diacylGPC geringer. Der Gehalt an plasmGPC nahm durch den Seminalplasmakontakt zu.

Der Lipid- und Proteingehalt in den oberen DRM-Banden war in den mit Seminalplasma behandelten Nebenhodenspermien geringer als in den unbehandelten Nebenhodenspermien. Dass in den oberen DRM-Banden kaum Lipid und Protein gefunden wurde, steht auch im Gegensatz zu den Ejakulatspermien (vgl. **Tabelle 16** und **Tabelle 28**). Beim Vergleich der Gehalte an GPE und SM in den DRM-Banden der behandelten und unbehandelten Nebenhodenspermien deuteten sich zwar die gleichen Tendenzen an wie beim Vergleich dieser Lipidgehalte zwischen Ejakulat- und Nebenhodenspermien (vgl. **Tabelle 20** und **Tabelle 29**), dennoch sind die Unterschiede zwischen DRMs aus mit Seminalplasma behandelten Nebenhodenspermien und aus Ejakulatspermien so gravierend, dass davon ausgegangen wird, auf diesem Wege keine künstlichen „Ejakulatspermien“ erzeugt zu haben. Vermutlich müssen die Inkubationsbedingungen mit dem Seminalplasma verändert werden, beispielsweise könnte eine längere Inkubationszeit nötig sein. So wurden Nebenhodenspermien von Bullen für 60 Minuten bei 37°C in Seminalplasma inkubiert, um den Ejakulationsvorgang zu simulieren [33]. Sicherlich spielt es auch eine große Rolle, dass das Seminalplasma zwischen der Gewinnung und dem Inkubationsversuch mit den Nebenhodenspermien eingefroren wurde, da es aus technischen Gründen nicht möglich war, Nebenhodenspermien und Seminalplasma am gleichen Tag zu gewinnen. Der Einfrierprozess zerstörte dabei sicherlich wichtige Membranstrukturen. Auch der Kontakt des Seminalplasmas zu seinen Originalspermien kann bereits Veränderungen der Zusammensetzung bewirkt haben, indem Lipide von den Spermien aufgenommen oder abgegeben wurden.

Die Herkunft des Seminalplasmas, d. h. vom welchem Eber dieses isoliert wurde, hatte im Rahmen der sehr kleinen Stichprobe keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Untersuchung.

In der folgenden Abbildung sind die wichtigsten Veränderungen an den Spermien, Überständen und vor allem den DRMs im Laufe der Nebenhodenpassage und nach dem Seminalplasmakontakt, die in den Untersuchungen festgestellt wurden, zusammenfassend dargestellt:

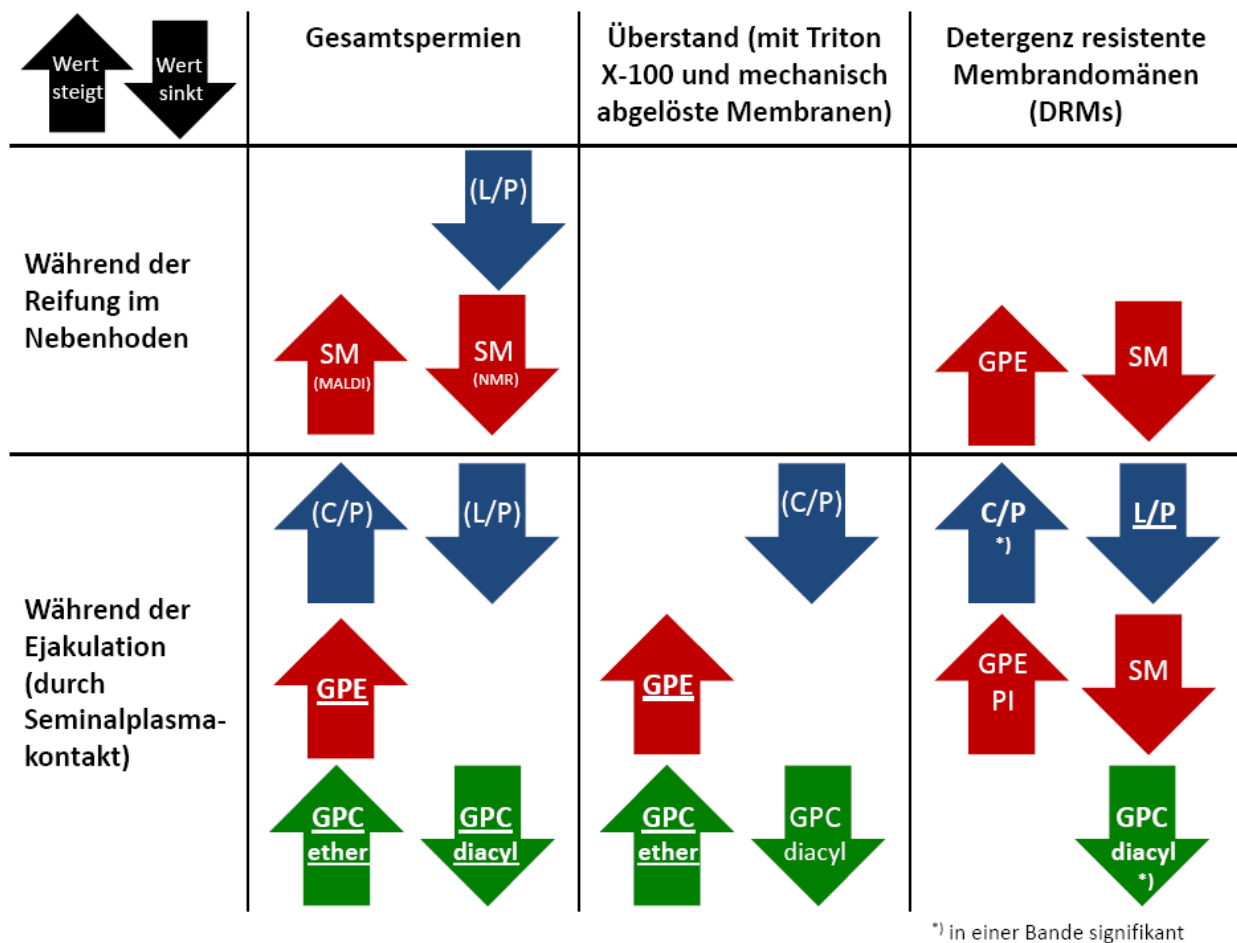


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Veränderungen an Eberspermien, den mit Triton-X 100 und mechanisch abgelösten Spermienmembranen (Überstand) und den daraus mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isolierten DRMs während der Nebenhodenpassage und nach Kontakt mit Seminalplasma (C/P: Cholesterol zu Phospholipidverhältnis, L/P: Lipid zu Proteinverhältnis, Werte in Klammern: leichte Tendenzen, Werte ohne Klammern: Tendenzen, unterstrichene und fette Werte: signifikante Veränderungen)

5.3 Individuelle Unterschiede in der Zusammensetzung der DRMs aus Eberspermien und die Toleranz gegenüber der Lagerung bei tiefen Temperaturen

Bei den generell kältesensitiven Eberspermien ließen sich bei der Untersuchung der Spermien von 64 Ebern Individuen finden, deren Spermien eine höhere Toleranz gegenüber der Lagerung bei kalten Temperaturen (4°C) aufwiesen. Wiederholte Untersuchungen verschiedener Ejakulate ausgewählter Individuen zeigten, dass dieser Unterschied individuell bedingt und nicht ejakulatspezifisch zu sein scheint. Dies beschreiben auch Waterhouse *et al.* in ihrer Studie [125]. Bei unserer Untersuchung gab es zwar Eber mit wechselnder

Kryotoleranz (HP 172, Max 25, HP 204, HP 163), aber die Spermien einzelner Eber mit besonders ausgeprägter Toleranz oder Sensitivität gegenüber der Lagerung bei 4°C blieben in ihrem Verhalten konstant. So waren die Spermien der Eber Max 39 und Max 46 besonders kältesensitiv und die Spermien der Eber Max 27 und Max 61 kälteresistent, wobei diese Eigenschaft bei den Spermien von Max 27 am stärksten ausgeprägt war. Die Keimbelastung der bei 4°C gelagerten Proben war wie erwartet geringer.

Bei der Untersuchung der DRM-Zusammensetzung ließen sich Unterschiede in der Lipidzusammensetzung zwischen den kältesensitiven und kälteresistenten den Spermien finden: Zu Beginn der Versuche wurde beim Vergleich der DRM-Banden der Eber Max 46 und Max 27 eine zusätzliche Bande beim erstgenannten kältesensitiven Eber festgestellt. Dies ließ sich mit der Untersuchung der weiteren Eber nicht bestätigen. Da diese Bande stärker bei den 4°C-Proben auftrat, könnte es sich möglicherweise um DRMs aus bereits absterbenden Spermien handeln, die sich in ihrer Zusammensetzung veränderten. Um einen Effekt durch absterbende Zellen zu vermeiden, wurden für die Untersuchungen der DRM-Lipide die Gradienten der bei 16°C gelagerten Proben verwendet.

Bei den NMR-Analysen (**Tabelle 38**) wurde bei den kälteresistenten Spermien in der obersten Bande ein etwas erhöhter Anteil an GPE und ein etwas geringerer Anteil an SM gefunden. Demgegenüber kehrten sich in der mittleren Bande (Bande b) diese Verhältnisse um. Da nicht beide Banden die gleichen Tendenzen zeigten und die Unterschiede sowie der Probenumfang sehr gering waren, handelte es sich vermutlich um messbedingte Schwankungen. Der prägnanteste Unterschied war ein verringerter diacylGPC- und ein erhöhter plasmGPC-Gehalt bei den DRM-Banden der kälteresistenten Spermien, sodass sich ein niedriges diacylGPC/plasmGPC-Verhältnis positiv auf die Kryotoleranz auszuwirken schien (**Tabelle 40**). Da an die diacylGPCs vorwiegend gesättigte Fettsäuren gebunden sind und an die plasmGPCs vorwiegend langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren, ließe sich daraus schließen, dass ein geringerer Anteil gesättigter Fettsäuren die Kryotoleranz erhöhte. Dieses Ergebnis stünde auch in Kongruenz zu den MALDI-TOF MS Analysen. Durch vorherige Trennung mittels TLC konnte das störende Triton-X 100 entfernt werden, sodass eine massenspektrometrische Untersuchung möglich war. Außerdem konnte so explizit die GPC-Komponente untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass sich die DRMs der kälteresistenten Spermien durch einen niedrigeren Anteil an GPCs mit gesättigten Fettsäuren auszeichneten. Physiologisch wäre dieser Unterschied damit erklärbar, dass der höhere Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren die Membranfluidität erhöht, da die ungesättigten

Fettsäuren für eine weniger dichte Packung der Membran sorgen [74]. Dies gilt vor allem für die weniger fluiden Anteile der Membran, die mit Detergenzien isoliert werden. Diese reagieren sicherlich besonders empfindlich auf zu geringe Temperaturen. Somit kann die Membran ihre Fluidität auch bei tieferen Temperaturen länger erhalten. Ein hoher Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren verringert die Phasen-Transitionstemperatur der Membran [135]. In die gleiche Richtung weisen die Ergebnisse von Waterhouse *et al.* [125]: Jene entdeckten in den Membranen von Eberspermien, die den Gefrier- und Tauprozess besser überstehen, einen erhöhten Anteil von langkettigen, mehrfach gesättigten Fettsäuren. Auch Swain und Miller [113] fanden bei Spermien von Elefantenbulln heraus, dass sich die Spermien von afrikanischen Elefantenbulln besser einfrieren lassen als die Spermien asiatischer Elefantenbulln, die einen geringeren Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in ihren Membranen aufweisen. Auch beim Vergleich anderer Tierarten scheinen Spermien mit einem geringeren Anteil gesättigter Fettsäuren und mehr ungesättigten Fettsäuren ein besseres Verhalten gegenüber der Lagerung bei 4°C aufzuweisen [2]. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass sich diese Ergebnisse nicht auf DRMs sondern auf die Spermienmembranen oder die Gesamtspermien beziehen, bei denen in den eigenen Untersuchungen keine prägnanten Unterschiede festgestellt wurden. So scheint sich ein erhöhter Anteil an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Spermienmembran allgemein positiv auf die Kryotoleranz auszuwirken. Bei den üblicherweise kälteempfindlichen Eberspermien scheint aber gerade die Feinabstimmung der Lipidzusammensetzung in den DRMs für das individuelle Verhalten bei der Lagerung bei 4°C zu sorgen.

Bei den Inkubationsversuchen von Nebenhodenspermien mit isoliertem Seminalplasma besaßen die Nebenhodenspermien ohne Seminalplasmakontakt nach Lagerung bei 4°C eine höhere Motilität als die Nebenhodenspermien mit Seminalplasmakontakt. Die Herkunft des Seminalplasmas, d. h. ob der Donoreber kältesensitive oder kälteresistente Spermien produzierte, schien – im Rahmen der sehr kleinen Stichprobe - keinen Einfluss zu haben. Auch in der Literatur wird Nebenhodenspermien im Vergleich zu Ejakulatspermien eine höhere Kälteresistenz zugeschrieben [80]. Die ermittelten Lipidverhältnisse in den Nebenhodenspermien zeigten gegenüber Ejakulatspermien allerdings eher einen höheren diacylGPC-Anteil in den DRM-Banden und in den Gesamtspermien vermehrt Lipide mit kurzen, gesättigten Fettsäuren. Dies steht im Widerspruch zu der oben geäußerten Vermutung, sodass das gehäufte Auftreten von mehr Plasmalogenen und Lipiden mit langkettigen ungesättigten Fettsäuren in den DRMs wahrscheinlich nicht die alleinige Ursache für die

Kälteresistenz von Eberspermien darstellt. Beispielweise könnten mögliche destabilisierende Effekte durch den steigenden GPE-Gehalt und sinkenden SM-Gehalt in den DRMs nach Seminalplasmakontakt für die höhere Kälteempfindlichkeit der Ejakulatspermien sorgen.

Auch wenn in diesen Untersuchungen kein Einfluss des Seminalplasmas auf die Kryotoleranz nachgewiesen werden konnte, wird in der Literatur ein individueller Einfluss des Seminalplasmas oder seiner Proteine auf die Gefriertauglichkeit der Spermien postuliert [69]. Zumindest hatten im Rahmen der Untersuchung des Seminalplasmas die isolierten, gelartigen Pellets von Eber Max 27 mit den kälteresistenten Spermien bei den NMR-Untersuchungen einen erhöhten Anteil an plasmGPC. Dies steht in Kongruenz zu den Ergebnissen der DRM-Untersuchungen der kälteresistenten Spermien.

Um festzustellen, ob auch in der Proteinzusammensetzung der DRMS aus Spermien unterschiedlicher Kältetoleranz Unterschiede bestehen, wurden SDS-PAGE-Analysen durchgeführt. Dabei ließen sich keine Unterschiede in den Bandenmustern der SDS-PAGES zwischen den DRMs der kältesensitiven und der kälteresistenten Spermien feststellen. Um eventuelle kleine Unterschiede genauer zu analysieren, wäre es meines Erachtens zweckmäßig, die Proben zukünftig mittels einer vergleichenden zweidimensionalen Gelelektrophorese zu untersuchen, wie sie zurzeit am Institut etabliert wird. Durch mittlerweile immer sensitivere Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der Proteinspots und dem Einsatz von mehr Probe für die Proteinanalytik (ohne zeitgleiche Lipidanalytik), sollten auch die dafür benötigten Probenmengen ausreichend sein. Auch eine Western-Blot-Analyse mit Antikörpern, z. B. für Spermadhesine, könnte eine genauere Aussage ermöglichen. Dies war bisher allerdings nicht möglich, da keine artspezifischen Antikörper zur Verfügung standen. Mit ersten inzwischen rekombinant vorliegenden Spermadhesinen des Ebers [99], könnten nun passende Antikörper erstellt werden.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse des Eberscreenings stellte sich die Frage, warum der Anteil von Ebern mit kälteresistenten Spermien so gering ist. Bei den 64 getesteten Ebern waren in Abhängigkeit vom betrachteten Parameter die Spermien von nur etwa 10% der Eber kälteresistent - bei den Motilitätsuntersuchungen nach 24 Stunden waren 13% der Proben kälteresistent, beim Thermoresistenztest stellten sich nur noch die Spermien von 6% der Eber als kälteresistent heraus [42]. Abgesehen davon, dass bei der natürlichen Selektion kein Selektionsdruck auf kälteresistente Spermien besteht, könnten die Eber mit kälteresistenten Spermien zusätzlich einen anderen Selektionsnachteil haben. So bleibt z. B. fraglich, ob die

Fertilität durch die veränderte Membranzusammensetzung beeinträchtigt ist. Daten zur Fertilität der untersuchten Eber liegen leider nicht vor, da in der landwirtschaftlichen Produktion zur Erhöhung der Fertilität häufig auch Mischbesamungen durchgeführt werden. Als Ursache für eine geringe Fertilität könnte eine Störung der feinabgestimmten Fluidität der Membrandomänen verantwortlich sein, mit der die Spermienzelle auf ihre diversen Aufgaben reagieren muss.

Ein weiterer Nachteil eines erhöhten Anteils mehrfach ungesättigter Fettsäuren in den Membranen ist eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Prozessen [126]. Dies würde sich ebenfalls negativ auf die Fertilität und damit auf die natürliche Selektion auswirken. Die höhere Anzahl von Doppelbindungen kann leichter mit reaktiven Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species* = ROS) reagieren. Als Folge entstehen Lysolipidverbindungen, die aufgrund ihrer veränderten sterischen Form durch die fehlende Fettsäure die Membran destabilisieren [127] oder für eine vorzeitige Kapazitation und Akrosomenreaktion sorgen können [60, 84]. Bei Wiederkäuer- und auch Eberspermien kommt außerdem der hohe Plasmalogengehalt hinzu, der zusätzlich für eine höhere Empfindlichkeit gegenüber den ROS sorgt [28]. Die eigenen Untersuchungen zeigten keinen erhöhten Anteil an LPCs oder FormylLPCs in den kälteresistenten Spermien (4.5.3.5), möglicherweise sind die antioxidativen Repairmechanismen in Eberspermien so effektiv, dass gebildete Lysolipide rasch reacyliert werden.

Die Ernährung hat einen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung von Gameten [64, 126, 135]. So erhöht ein Zusatz von Fischöl in der Nahrung den Anteil an Docosahexaensäure in den Spermien von Ebern [64]. Eine Einflussnahme auf die Lipidzusammensetzung der untersuchten Spermien durch unterschiedliche Ernährung kann bei unserer Untersuchung aber ausgeschlossen werden, da der untersuchte Tierpool aus der gleichen Eberstation stammt und die gleiche Ernährung erhielt.

Ein möglicher Rasseinfluss konnte bei den untersuchten Tieren nicht beobachtet werden. Die 64 überprüften Eber gehörten den Eberrassen *Hermitage Pietrain* (HP), *Maxgro* (= *Large White*, Max) oder der Landrasse (D) an (die Rassezugehörigkeit lässt sich an den Kürzeln im Ebernamen erkennen). Es konnte nicht festgestellt werden, dass eine Rasse bei den kälteresistenten Spermien überrepräsentiert war. Sowohl die Eber der besonders kältesensitiven als auch die Eber der kälteresistenten Spermien, an denen die weiteren Untersuchungen vorgenommen wurden, gehörten alle zur gleichen Rasse (Maxgro). Auch

Waterhouse *et al.* stellten in ihren Untersuchungen keinen Einfluss der Rasse auf die Kälteempfindlichkeit von Eberspermien fest [125]. Thursten *et al.* entdeckten einen genetischen Einfluss auf die Gefriertauglichkeit von Eberspermien, indem sie AFLP-Marker (*amplified restriction fragment length polymorphism*-Marker) von Spermien unterschiedlicher Gefriertauglichkeit untersuchten [117]. Dabei stellten sie mittels logistischer Regressionsanalysen einen Zusammenhang der Gefriertauglichkeit zu bestimmten Polymorphismen fest. Diese Polymorphismen könnten dann möglicherweise Genen zugeordnet werden, die einen Einfluss auf die Gefriertauglichkeit der Eberspermien besitzen.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wäre eine Lagerung bei tieferen Temperaturen vor allem in Bezug auf die Keimbelastung und die damit verbundene mögliche Reduzierung zugesetzter Antibiotika von Vorteil. Vor einer Fokussierung auf Eber mit kälteresistenten Eberspermien bei der Zuchtauswahl sollte allerdings genau überprüft werden, ob diese Eigenschaft die Fertilität negativ beeinflusst.

5.4 Ausblick

Die in den Untersuchungen festgestellte Zusammensetzung der DRMs in den Eberspermien und deren Veränderungen während der Nebenhodenpassage sowie nach Kontakt mit Seminalplasma sollte noch mit weiteren Methoden verifiziert werden. Dabei könnten moderne Fluoreszenztechniken zum Einsatz kommen, um vor allem zu überprüfen, wie die gefundenen Veränderungen mit *in vivo* zu beobachtenden Vorgängen in Verbindung stehen. Beispielsweise könnten fluoreszenzmarkierte Lipide und Proteine in den lebenden Spermien mittels Techniken wie der STED-Mikroskopie verfolgt werden, wie dies in den Arbeiten von von Eggeling *et al.* und Owen *et al.* beschrieben wird [22, 85]. Besonders die Betrachtung von Sphingomyelin, Cholesterol und Proteinen mit einem GPI-Anker könnte bei dieser Methode Aufschluss darüber geben, ob sich diese Moleküle zeitweise in stark eingegrenzten Gebieten der Membran aufhalten, wie dies Eggeling *et al.* an Epithelzellen feststellen konnten. Sicherlich wäre es dabei auch interessant, Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien vergleichend zu untersuchen, ebenso wie zu analysieren, ob es für die unterschiedlichen Regionen in den Spermien (akrosomaler und postakrosomaler Kopfbereich, Mittelstück und Schwanz) unterschiedliche Bewegungsmuster der fluoreszenzmarkierten Moleküle gibt. Mittels der FRAP-Technik könnte zuvor untersucht werden, ob es für fluoreszenzmarkierte Lipidmoleküle (z. B. NBD-Cholesterol, NBD-SM und NBD-PC) Orte in

den Spermien gibt, in denen diese Moleküle unterschiedliche Beweglichkeiten aufweisen, und ob sich diese vor allem auch zwischen Nebenhoden- und Ejakulatspermien unterscheiden.

Desweiteren könnte mit den isolierten DRMs versucht werden, künstliche Vesikel zu rekonstituieren und diese zu untersuchen, indem beispielsweise die Lebenszeiten von fluoreszenzmarkierten Lipiden in den DRMs der verschiedenen Spermien (Nebenhodenspermien, Ejakulatspermien) verglichen werden.

Vor allem auch die Proteine der DRMs sollten tiefergehender untersucht werden. Dabei könnten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese auch kleinere Unterschiede in der Zusammensetzung der DRMs aus den Spermien der verschiedenen Reifestadien und nach Seminalplasmakontakt aufgedeckt werden. Mittels Trypsinverdau, massenspektrometrischer Analyse und anschließender Datenbanksuche könnten interessant erscheinende Kandidatenproteine aufgedeckt werden. Für solche Proteine wäre es denkbar, Antikörper zu erstellen, um die Verteilung der Proteine in den Spermien der verschiedenen Reifestadien und nach Seminalplasmakontakt anschließend fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen oder mittels Western-Blot das Vorhandensein dieser Proteine in den DRMs zu überprüfen.

Die mikroskopischen Techniken würden sich durch die benötigten geringen Probenmengen auch auf weitere Tierarten anwenden lassen, sofern – zumindest für die Untersuchung der Proteine – passende Antikörper erstellt werden können. Die Untersuchung der Lipide würde sich aufgrund ihrer Universalität deutlich einfacher gestalten. Kenntnisse der Vorgänge, wie sie bei der Reifung im Nebenhoden und vor allem auch nach Seminalplasmakontakt ablaufen, sind enorm wichtig, um sie möglichst gut *in vitro* simulieren zu können, denn künstliche Reproduktionstechniken stellen heutzutage einen wichtigen Bestandteil von Arterhaltungsprojekten dar. Häufig kommen dabei aus Mangel an Ejakulatspermien Nebenhodenspermien zum Einsatz, die ggf. künstlich gereift werden müssen.

Wie bereits erwähnt, wäre bei der landwirtschaftlichen Produktion eine Lagerung von Eberspermien bei 4°C eine Möglichkeit, die Menge der zurzeit eingesetzten Antibiotika zu minimieren. Vor der Fokussierung auf Eber mit kälteresistenten Spermien bei der Zuchtauswahl sollte jedoch die Fertilität dieser Spermien sorgfältig überprüft werden. Einen ersten Aufschluss könnte dabei möglicherweise eine Untersuchung der Befähigung dieser Spermien zur *in vitro*-Kapazitation und -Akrosomenreaktion liefern.

Sicherlich wäre es auch denkbar, die gefundenen Veränderungen bei den kälteresistenten Eberspermien durch den Zusatz der entsprechenden Lipide bzw. Fettsäuren in den kältesensitiven Spermien künstlich zu erzeugen. Ähnliche Versuche dazu zeigten vielversprechende Ergebnisse und vor allem auch, dass Spermien dazu in der Lage sind, Fettsäuren in ihre Membran aufzunehmen [112]. Ob diese dann auch in die Strukturen übergehen, die in den DRMs isoliert werden, wäre zu überprüfen. Aufgrund der hohen Dynamik von Membrandomänen wäre dies allerdings vorstellbar.

Auch für die Arterhaltung sind Kenntnisse der Einfriereigenschaften der Spermien einer entsprechenden Tierart enorm wichtig, da eine Lagerung im gefrorenen Zustand zumeist nicht vermieden werden kann, denn eine zeitgleiche Verfügbarkeit der Gameten beider Geschlechter am gleichen Ort ist häufig kaum realisierbar. Hierbei könnte die Entwicklung entsprechender Untersuchungstechniken helfen, lange und aufwändige Anpassungen der Einfrierprotokolle zu vermeiden.

6. Literaturverzeichnis

1. Althouse, G.C., M.S. Pierdon, and K.G. Lu, *Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen*. Theriogenology, 2008. **70**(8): p. 1317-1323.
2. Arav, A., M. Pearl, and Y. Zeron, *Does membrane lipid profile explain chilling sensitivity and membrane lipid phase transition of spermatozoa and oocytes?* Cryo Letters, 2000. **21**(3): p. 179-186.
3. Arvidson, G., G. Ronquist, G. Wikander, and A.C. Ojteg, *Human prostatesome membranes exhibit very high cholesterol/phospholipid ratios yielding high molecular ordering*. Biochim Biophys Acta, 1989. **984**(2): p. 167-173.
4. Asano, A., V. Selvaraj, D.E. Buttke, J.L. Nelson, K.M. Green, J.E. Evans, and A.J. Travis, *Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: identification of three distinct sub-types of membrane rafts*. J Cell Physiol, 2009. **218**(3): p. 537-548.
5. Bathgate, R., W.M. Maxwell, and G. Evans, *Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality*. Reprod Domest Anim, 2006. **41**(1): p. 68-73.
6. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-917.
7. Boerke, A., P.S. Tsai, N. Garcia-Gil, I.A. Brewis, and B.M. Gadella, *Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction*. Theriogenology, 2008. **70**(8): p. 1188-1196.
8. Botto, L., N. Bernabo, P. Palestini, and B. Barboni, *Bicarbonate induces membrane reorganization and CBR1 and TRPV1 endocannabinoid receptor migration in lipid microdomains in capacitating boar spermatozoa*. J Membr Biol, 2010. **238**(1-3): p. 33-41.
9. Bou Khalil, M., K. Chakrabandhu, H. Xu, W. Weerachatanukul, M. Buhr, T. Berger, E. Carmona, N. Vuong, P. Kumarathanan, P.T. Wong, D. Carrier, and N. Tanphaichitr, *Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid*. Dev Biol, 2006. **290**(1): p. 220-235.
10. Brown, D.A. and E. London, *Functions of lipid rafts in biological membranes*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 111-136.
11. Bruckbauer, A., P. James, D. Zhou, J.W. Yoon, D. Excell, Y. Korchev, R. Jones, and D. Klenerman, *Nanopipette delivery of individual molecules to cellular compartments for single-molecule fluorescence tracking*. Biophys J, 2007. **93**(9): p. 3120-3131.

12. Buhr, M.M., E.F. Curtis, and N.S. Kakuda, *Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm*. Cryobiology, 1994. **31**(3): p. 224-238.
13. Buttke, D.E., J.L. Nelson, P.N. Schlegel, G.R. Hunnicutt, and A.J. Travis, *Visualization of GM1 with cholera toxin B in live epididymal versus ejaculated bull, mouse, and human spermatozoa*. Biology of Reproduction, 2006. **74**(5): p. 889-895.
14. Campbell, N.A., *Biologie*. 1st ed. 1997, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akad. Verl. p. 1440.
15. Cerolini, S., A. Maldjian, F. Pizzi, and T.M. Gliozzi, *Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen*. Reproduction, 2001. **121**(3): p. 395-401.
16. Chen, X., A. Jen, A. Warley, M.J. Lawrence, P.J. Quinn, and R.J. Morris, *Isolation at physiological temperature of detergent-resistant membranes with properties expected of lipid rafts: the influence of buffer composition*. Biochem J, 2009. **417**(2): p. 525-533.
17. Cross, N., *Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm*. Biol Reprod, 2004. **71**: p. 1367 - 1373.
18. Dietrich, C., L.A. Bagatolli, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, and E. Gratton, *Lipid rafts reconstituted in model membranes*. Biophys J, 2001. **80**(3): p. 1417-1428.
19. Dostalova, Z., J. Calvete, and E. Toepfer-Petersen, *Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1995. **376**: p. 237 - 242.
20. Drevot, P., C. Langlet, X.J. Guo, A.M. Bernard, O. Colard, J.P. Chauvin, R. Lasserre, and H.T. He, *TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts*. EMBO J, 2002. **21**(8): p. 1899-1908.
21. Edidin, M., *The state of lipid rafts: from model membranes to cells*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2003. **32**: p. 257-283.
22. Eggeling, C., C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V.N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schonle, and S.W. Hell, *Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell*. Nature, 2009. **457**(7233): p. 1159-1162.
23. Espinoza, F.A., M.J. Wester, J.M. Oliver, B.S. Wilson, N.L. Andrews, D.S. Lidke, and S.L. Steinberg, *Insights into cell membrane microdomain organization from live cell single particle tracking of the IgE high affinity receptor FcRI of mast cells*. Bull Math Biol, 2012. **74**(8): p. 1857-1911.

24. Flesch, F.M. and B.M. Gadella, *Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1469**(3): p. 197-235.
25. Frenette, G., J. Girouard, O. D'Amours, N. Allard, L. Tessier, and R. Sullivan, *Characterization of two distinct populations of epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine cauda epididymis*. Biol Reprod, 2010. **83**(3): p. 473-480.
26. Fuchs, B., K. Arnold, and J. Schiller, *Mass spectrometry of biological molecules*. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2008: p. 1 - 39.
27. Fuchs, B., U. Jakop, F. Goeritz, R. Hermes, T. Hildebrandt, J. Schiller, and K. Mueller, *MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloidea spermatozoa*. Theriogenology, 2009. **71**(4): p. 568-575.
28. Fuchs, B., K. Mueller, F. Goeritz, S. Blottner, and J. Schiller, *Characteristic oxidation products of choline plasmalogens are detectable in cattle and roe deer spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry*. Lipids, 2007. **42**(11): p. 991-998.
29. Gadella, B.M., N.G. Miller, B. Colenbrander, L.M. van Golde, and R.A. Harrison, *Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts*. Mol Reprod Dev, 1999. **53**(1): p. 108-125.
30. Gadella, B.M., P.S. Tsai, A. Boerke, and I.A. Brewis, *Sperm head membrane reorganisation during capacitation*. Int J Dev Biol, 2008. **52**(5-6): p. 473-480.
31. Gamboa, S. and J. Ramalho-Santos, *SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility*. Theriogenology, 2005. **64**(2): p. 275-291.
32. Ghaoui Rel, H., P.C. Thomson, G. Evans, and W.M. Maxwell, *Characterization and localization of membrane vesicles in ejaculate fractions from the ram, boar and stallion*. Reprod Domest Anim, 2004. **39**(3): p. 173-180.
33. Girouard, J., G. Frenette, and R. Sullivan, *Seminal plasma proteins regulate the association of lipids and proteins within detergent-resistant membrane domains of bovine spermatozoa*. Biol Reprod, 2008. **78**: p. 921-931.
34. Girouard, J., G. Frenette, and R. Sullivan, *Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa*. Biol Reprod, 2009. **80**(5): p. 965-972.
35. Girouard, J., G. Frenette, and R. Sullivan, *Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis*. Int J Androl, 2011. **34**(5 Pt 2): p. e475-e486.
36. Grunewald, S., U. Paasch, H.J. Glander, and U. Anderegg, *Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA*. Andrologia, 2005. **37**(2-3): p. 69-71.

37. Grzybek, M., J. Kubiak, A. Lach, M. Przybylo, and A.F. Sikorski, *A raft-associated species of phosphatidylethanolamine interacts with cholesterol comparably to sphingomyelin. A Langmuir-Blodgett monolayer study.* PLoS One, 2009. **4**(3): p. e5053 (1-10).
38. Hancock, J.F., *Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(6): p. 456-462.
39. Hao, M., S. Mukherjee, and F.R. Maxfield, *Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13072-13077.
40. Hernandez, M., J. Roca, J.J. Calvete, L. Sanz, T. Muino-Blanco, J.A. Cebrian-Perez, J.M. Vazquez, and E.A. Martinez, *Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars.* J Androl, 2007. **28**(5): p. 689-697.
41. Jakop, U., *Extraktion und Detektion von Lipiden aus Eberspermien in unterschiedlichen Detergenzien.* 2007, im Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin (Diplomarbeit)
42. Jakop, U., B. Fuchs, K. Ruediger, J. Schiller, K. Mueller, and M. Schulze, *Screening of boar sperm for their resistance to storage at low temperatures.* Reprod Domestic Anim, 2012. **47** (Suppl. 2): p. 7.
43. Jakop, U., B. Fuchs, R. Suess, G. Wibbelt, B. Braun, K. Mueller, and J. Schiller, *The solubilisation of boar sperm membranes by different detergents - a microscopic, MALDI-TOF MS, (31)P NMR and PAGE study on membrane lysis, extraction efficiency, lipid and protein composition.* Lipids Health Dis, 2009. **8**: p. 49 (1-16).
44. James, P.S., C. Hennessy, T. Berge, and R. Jones, *Compartmentalisation of the sperm plasma membrane: a FRAP, FLIP and SPFI analysis of putative diffusion barriers on the sperm head.* Journal of Cell Science, 2004. **117**(26): p. 6485-6495.
45. James, P.S., C.A. Wolfe, S. Ladha, and R. Jones, *Lipid diffusion in the plasma membrane of ram and boar spermatozoa during maturation in the epididymis measured by fluorescence recovery after photobleaching.* Mol Reprod Dev, 1999. **52**(2): p. 207-215.
46. Jones, R., E. Howes, P.D. Dunne, P. James, A. Bruckbauer, and D. Klenerman, *Tracking diffusion of GM1 gangliosides and zona pellucida binding molecules in sperm plasma membranes following cholesterol efflux.* Dev Biol, 2010.
47. Jones, R., P.S. James, L. Howes, A. Bruckbauer, and D. Klenerman, *Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation.* Asian J Androl, 2007. **9**(4): p. 438-444.
48. Jones, R.C., J.L. Dacheux, B. Nixon, and H.W. Ecroyd, *Role of the epididymis in sperm competition.* Asian J Androl, 2007. **9**(4): p. 493-499.

49. Jones, R.E., *Synthesis of ether lipids and phosphatidylethanolamine by ejaculated human spermatozoa*. Arch Androl, 1997. **38**(3): p. 181-189.
50. Kawano, N., K. Yoshida, T. Iwamoto, and M. Yoshida, *Ganglioside GM1 mediates decapacitation effects of SVS2 on murine spermatozoa*. Biol Reprod, 2008. **79**(6): p. 1153-1159.
51. Kawano, N., K. Yoshida, K. Miyado, and M. Yoshida, *Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis*. J Lipids, 2011. **2011**: p. ID264706 (1-10).
52. Kennedy, C., M.D. Nelson, and A.K. Bamezai, *Analysis of detergent-free lipid rafts isolated from CD4+ T cell line: interaction with antigen presenting cells promotes coalescing of lipid rafts*. Cell Commun Signal, 2011. **9**(1): p. 31 (1-13).
53. Korlach, J., P. Schuille, W.W. Webb, and G.W. Feigenson, *Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8461-8466.
54. Kurz, A., *Die transversale Lipidorganisation der Zellmembran von Eberspermien waehrend der Kapazitation*. 2000, im Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin (Diplomarbeit)
55. Kurz, A., D. Viertel, A. Herrmann, and K. Mueller, *Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction*. Reproduction, 2005. **130**(5): p. 615-626.
56. Ladha, S., *Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon*. J Membr Biol, 1998. **165**(1): p. 1-10.
57. Lenne, P.F., L. Wawrezinieck, F. Conchonaud, O. Wurtz, A. Boned, X.J. Guo, H. Rigneault, H.T. He, and D. Marguet, *Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork*. EMBO J, 2006. **25**(14): p. 3245-3256.
58. Lessig, J., C. Gey, R. Suess, J. Schiller, H.J. Glander, and J. Arnhold, *Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and 31P NMR spectroscopy*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2004. **137**(2): p. 265-277.
59. Lichtenberg, D., F.M. Goni, and H. Heerklotz, *Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts*. Trends Biochem.Sci, 2005. **30**(8): p. 430-436.
60. Llanos, M.N., P. Morales, and M.S. Rizzo, *Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro*. J Exp Zool, 1993. **267**(2): p. 209-216.
61. Lommerse, P.H., H.P. Spaink, and T. Schmidt, *In vivo plasma membrane organization: results of biophysical approaches*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1664**(2): p. 119-131.

62. London, E. and G. Feigenson, *Phosphorus NMR analysis of phospholipids in detergents*. J Lipid Res, 1979. **20**: p. 408 - 412.
63. Loura, L.M., M. Prieto, and F. Fernandes, *Quantification of protein-lipid selectivity using FRET*. Eur Biophys J, 2010. **39**(4): p. 565-578.
64. Maldjian, A., F. Pizzi, T. Gliozzi, S. Cerolini, P. Penny, and R. Noble, *Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen*. Theriogenology, 2005. **63**(2): p. 411-421.
65. Masson, D., V. Drouineaud, P. Moiroux, T. Gautier, G. Dautin, M. Schneider, J. Fruchart-Najib, M. Jauhiainen, C. Ehnholm, P. Sagot, P. Gambert, C. Jimenez, and L. Lagrost, *Human seminal plasma displays significant phospholipid transfer activity due to the presence of active phospholipid transfer protein*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(8): p. 457-464.
66. Mayor, S. and M. Rao, *Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface*. Traffic, 2004. **5**(4): p. 231-240.
67. Mayorga, L.S., C.N. Tomes, and S.A. Belmonte, *Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion*. IUBMB Life, 2007. **59**(4-5): p. 286-292.
68. McIntosh, T.J., A. Vidal, and S.A. Simon, *Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts*. Biophys J, 2003. **85**(3): p. 1656-1666.
69. Medrano, A., W.V. Holt, and P.F. Watson, *Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation*. Andrologia, 2009. **41**(4): p. 246-250.
70. Mikhalyov, I. and A. Samsonov, *Lipid raft detecting in membranes of live erythrocytes*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(7): p. 1930-1939.
71. Miyado, K., et al., *The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 12921-12926.
72. Morrell, J.M. and H. Rodriguez-Martinez, *Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency*. Vet Med Int, 2010. **2011**: p. ID894767 (1-9).
73. Morris, R.J., A. Jen, and A. Warley, *Isolation of nano-meso scale detergent resistant membrane that has properties expected of lipid 'rafts'*. J Neurochem, 2011. **116**(5): p. 671-677.
74. Mueller, K., P. Mueller, G. Pincemy, A. Kurz, and C. Labbe, *Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa*. Biol Reprod, 2008. **78**(3): p. 390-399.

75. Mueller, K., T. Pomorski, P. Mueller, and A. Herrmann, *Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 1)**: p. 11-20.
76. Mueller, K., T. Pomorski, P. Mueller, A. Zachowski, and A. Herrmann, *Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells*. Biochemistry, 1994. **33**(33): p. 9968-9974.
77. Muller, G., S.A. Santos, K. Meyer Barp, K. Teuber, N.R. Morais, J. Schiller, and K. Mueller. *Lipid composition of epididymal spermatozoa from domestic cats*. in *7th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife*. 2009. Berlin.
78. Munro, S., *Lipid rafts: elusive or illusive?* Cell, 2003. **115**(4): p. 377-388.
79. Nikolaus, J., S. Scolari, E. Bayraktarov, N. Jungnick, S. Engel, A. Pia Plazzo, M. Stoeckl, R. Volkmer, M. Veit, and A. Herrmann, *Hemagglutinin of influenza virus partitions into the nonraft domain of model membranes*. Biophys J, 2010. **99**(2): p. 489-498.
80. Nikolopoulou, M., D.A. Soucek, and J.C. Vary, *Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation*. Biochim Biophys Acta, 1985. **815**(3): p. 486-498.
81. Nixon, B. and R.J. Aitken, *The biological significance of detergent-resistant membranes in spermatozoa*. J Reprod Immunol, 2009. **83**(1-2): p. 8-13.
82. Nixon, B., A. Bielanowicz, E.A. McLaughlin, N. Tanphaichitr, M.A. Ensslin, and R.J. Aitken, *Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa*. J Cell Physiol, 2009. **218**(1): p. 122-134.
83. Nixon, B., L.A. Mitchell, A. Anderson, E.A. McLaughlin, M.K. O'Bryan, and R.J. Aitken, *Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes*. J Cell Physiol, 2010.
84. O'Flaherty, C., E. Breininger, N. Beorlegui, and M.T. Beconi, *Acrosome reaction in bovine spermatozoa: role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1726**(1): p. 96-101.
85. Owen, D.M., A. Magenau, D. Williamson, and K. Gaus, *The lipid raft hypothesis revisited - new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy*. Bioessays, 2012. **34**(9): p. 739-747.
86. Parks, J.E. and J.K. Graham, *Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes*. Theriogenology, 1992. **38**(2): p. 209-222.
87. Parks, J.E. and D.V. Lynch, *Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes*. Cryobiology, 1992. **29**(2): p. 255-266.

88. Pearce, J.M. and R.A. Komoroski, *Analysis of phospholipid molecular species in brain by (31)P NMR spectroscopy*. Magn Reson Med, 2000. **44**(2): p. 215-223.
89. Persaud-Sawin, D.A., S. Lightcap, and G.J. Harry, *Isolation of rafts from mouse brain tissue by a detergent-free method*. J Lipid Res, 2009. **50**(4): p. 759-767.
90. Pike, L.J., *Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function*. J Lipid Res., 2006. **47**(7): p. 1597-1598.
91. Pike, L.J., *The challenge of lipid rafts*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S323-S328.
92. Pike, L.J., X. Han, and R.W. Gross, *Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study*. J Biol Chem., 2005. **280**(29): p. 26796-26804.
93. Reisse, S., G. Rothardt, A. Volkl, and K. Beier, *Peroxisomes and ether lipid biosynthesis in rat testis and epididymis*. Biol Reprod, 2001. **64**(6): p. 1689-1694.
94. Satouh, Y., N. Inoue, M. Ikawa, and M. Okabe, *Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1*. J Cell Sci, 2012.
95. Schiller, J., J. Arnhold, H.-J. Glander, and K. Arnold, *Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy - effects of freezing and thawing*. Chem Phys Lipids, 2000. **106**(2): p. 145-156.
96. Schiller, J., K. Mueller, R. Suess, J. Arnhold, C. Gey, A. Herrmann, J. Lessig, K. Arnold, and P. Mueller, *Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry - a cautionary note*. Chem Phys Lipids, 2003. **126**(1): p. 85-94.
97. Schiller, J., M. Mueller, B. Fuchs, K. Arnold, and D. Huster, *31P NMR spectroscopy of phospholipids: From micelles to membranes*. Curr Anal Chem, 2007. **3**: p. 283 - 301.
98. Schroeter, F., *Charakterisierung von Fluoreszenz-Lebenszeiten fluoreszenzmarkierter Lipidanaloge in Säugerspermien*. 2009, im Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin (Bachelorarbeit)
99. Schroeter, F., *Rekombinante Expression von Spermadhäsinen des Schweins und ihre Wirkung auf Phospholipidmembranen*. 2012, im Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin (Masterarbeit)
100. Schulze, M., *Die Wirkung antimikrobieller Peptide (AMP) bei der Konservierung von Ebersperma*. 2009, im Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin (Dissertation)
101. Scolari, S., S. Engel, N. Krebs, A.P. Plazzo, R.F. De Almeida, M. Prieto, M. Veit, and A. Herrmann, *Lateral distribution of the transmembrane domain of influenza virus hemagglutinin revealed by time-resolved fluorescence imaging*. J Biol Chem, 2009. **284**(23): p. 15708-15716.

102. Shadan, S., P. James, E. Howes, and R. Jones, *Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa*. Biol Reprod, 2004. **71**: p. 253 - 265.
103. Sharma, P., R. Varma, R.C. Sarasij, Ira, K. Gousset, G. Krishnamoorthy, M. Rao, and S. Mayor, *Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes*. Cell, 2004. **116**(4): p. 577-589.
104. Shaw, A.S., *Lipid rafts: now you see them, now you don't*. Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1139-1142.
105. Shoeb, M., M. Laloraya, and P.G. Kumar, *Formation and dynamic alterations of horizontal microdomains in sperm membranes during progesterone-induced acrosome reaction*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(3): p. 763-770.
106. Siciliano, L., V. Marciano, and A. Carpino, *Prostasome-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa*. Reprod Biol Endocrinol, 2008. **6**: p. 5.
107. Simons, K. and M.J. Gerl, *Revitalizing membrane rafts: new tools and insights*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 688-699.
108. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk, *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
109. Stoeckl, M., A.P. Plazzo, T. Korte, and A. Herrmann, *Detection of lipid domains in model and cell membranes by fluorescence lifetime imaging microscopy of fluorescent lipid analogues*. J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 30828-30837.
110. Stryer, L., *Biochemie*. 4th ed. 1996, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akad. Verl. p. 1125.
111. Sullivan, R., G. Frenette, and J. Girouard, *Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit*. Asian J Androl, 2007. **9**(4): p. 483-491.
112. Svetlichnyy, V., *Aufnahme von Monocarbonsäuren in Spermatozoenlipide von Sus scrofa domestica und physiologische Auswirkungen*. 2012, im Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin (Dissertation)
113. Swain, J.E. and R.R. Miller, *A postcryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa*. Zoo Biology, 2000. **19**(5): p. 461-473.
114. Swierstra, E.E., *Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis*. Anat Rec, 1968. **161**(2): p. 171-185.
115. Terrell, K.A., D.E. Wildt, N.M. Anthony, B.D. Bavister, S.P. Leibo, L.M. Penfold, L.L. Marker, and A.E. Crosier, *Different patterns of metabolic cryo-damage in domestic cat*

- (*Felis catus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa. Cryobiology, 2012. **64**(2): p. 110-117.
116. Thaler, C.D., M. Thomas, and J.R. Ramalie, *Reorganization of mouse sperm lipid rafts by capacitation*. Mol Reprod Dev., 2006. **73**(12): p. 1541-1549.
 117. Thurston, L.M., K. Siggins, A.J. Mileham, P.F. Watson, and W.V. Holt, *Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation*. Biol Reprod, 2002. **66**(3): p. 545-554.
 118. Toepfer-Petersen, E., A. Romero, P.F. Varela, M. Ekhlesi-Hundrieser, Z. Dostalova, L. Sanz, and J.J. Calvete, *Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives*. Andrologia, 1998. **30**(4-5): p. 217-224.
 119. Tsai, P.S., K.J. De Vries, M. De Boer-Brouwer, N. Garcia-Gil, R.A. van Gestel, B. Colenbrander, B.M. Gadella, and H.T. Van, *Syntaxin and VAMP association with lipid rafts depends on cholesterol depletion in capacitating sperm cells*. Mol Membr.Biol, 2007. **24**(4): p. 313-324.
 120. van Gestel, R.A., I.A. Brewis, P.R. Ashton, J.F. Brouwers, and B.M. Gadella, *Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte*. Mol Hum Reprod, 2007. **13**(7): p. 445-454.
 121. van Gestel, R.A., I.A. Brewis, P.R. Ashton, J.B. Helms, J.F. Brouwers, and B.M. Gadella, *Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells*. Molecular Human Reproduction, 2005. **11**(8): p. 583-590.
 122. Vazquez, J.M. and E.R. Roldan, *Diacylglycerol species as messengers and substrates for phosphatidylcholine re-synthesis during Ca²⁺-dependent exocytosis in boar spermatozoa*. Mol Reprod Dev, 1997. **48**(1): p. 95-105.
 123. Veatch, S.L. and S.L. Keller, *Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol*. Biophys J, 2003. **85**(5): p. 3074-3083.
 124. Watanabe, H. and G. Kondoh, *Mouse sperm undergo GPI-anchored protein release associated with lipid raft reorganization and acrosome reaction to acquire fertility*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 15): p. 2573-2581.
 125. Waterhouse, K.E., P.O. Hofmo, A. Tverdal, and R.R. Miller, Jr., *Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm*. Reproduction, 2006. **131**(5): p. 887-894.
 126. Wathes, D.C., D.R. Abayasekara, and R.J. Aitken, *Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction*. Biol Reprod, 2007. **77**(2): p. 190-201.
 127. Watschinger, K. and E.R. Werner, *Orphan enzymes in ether lipid metabolism*. Biochimie, 2013. **95**(1): p. 59-65.

128. Weerachatanukul, W., I. Probohdh, K. Kongmanas, N. Tanphaichitr, and L.J. Johnston, *Visualizing the localization of sulfoglycolipids in lipid raft domains in model membranes and sperm membrane extracts*. Biochim.Biophys.Acta, 2007. **1768**(2): p. 299-310.
129. Weyand, A., *Evaluierung des Keimstatus im Ebersperma und Erstellung eines Hygienekonzepts für Labors in Schweinebesamungsstationen*. 2005, im Institut für Reproduktionsmedizin und Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Dissertation)
130. Wheeler, G. and K.M. Tyler, *Widefield microscopy for live imaging of lipid domains and membrane dynamics*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(3): p. 634-641.
131. Wolf, D.E., *Lipid domains in sperm plasma membranes*. Mol Membr Biol, 1995. **12**(1): p. 101-104.
132. Wolfe, C.A., P.S. James, A.R. Mackie, S. Ladha, and R. Jones, *Regionalized Lipid Diffusion in the Plasma Membrane of Mammalian Spermatozoa*. Biology of Reproduction, 1998. **59**(6): p. 1506-1514.
133. Zacharias, D.A., J.D. Violin, A.C. Newton, and R.Y. Tsien, *Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells*. Science, 2002. **296**(5569): p. 913-916.
134. Zee, Y.P., W.V. Holt, C.D. Allen, V. Nicolson, M. Burridge, A. Lisle, F.N. Carrick, and S.D. Johnston, *Effects of cryopreservation on mitochondrial function and heterogeneity, lipid raft stability and phosphatidylserine translocation in koala (Phascolarctos cinereus) spermatozoa*. Reprod Fertil Dev, 2007. **19**(7): p. 850-860.
135. Zeron, Y., D. Sklan, and A. Arav, *Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes*. Mol Reprod Dev, 2002. **61**(2): p. 271-278.
136. Zitanski, N., H. Borth, F. Ackermann, D. Meyer, L. Viewig, A. Breit, T. Gudermann, and I. Boekhoff, *The "acrosomal synapse": Subcellular organization by lipid rafts and scaffolding proteins exhibits high similarities in neurons and mammalian spermatozoa*. Commun Integr Biol, 2010. **3**(6): p. 513-521.

7. Anhang

7.1 Weitere Daten

Zu Kapitel 4.5.2:

Motilitätsdaten der wiederholten Untersuchung von Ejakulaten individueller Eber

Tabelle 44: Motilitätsdaten von Eberspermien nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen. Blau gekennzeichnet sind die Werte der beiden Eber, die die geringsten Unterschiede zwischen beiden Lagerungstemperaturen zeigten (kälteresistent), in rot die der beiden Eber, die die größten Unterschiede aufwiesen (kältesensitiv), die zugehörigen Diagramme sind in Abbildung 27 und Abbildung 28 zu finden.

Eber (n: 4°C/16°C)	Lage- rungszeit [Stunden]	16°C-Lagerung		4°C-Lagerung	
		Motil [%]	Progressiv [%]	Motil [%]	Progressiv [%]
Max 27 (10/7)	24	86,3 ± 7,5	80,3 ± 7,8	85,5 ± 5,2	76,0 ± 8,5
	48	89,8 ± 2,8	82,6 ± 2,9	82,7 ± 5,6	73,6 ± 6,6
	72	86,9 ± 4,3	80,9 ± 4,4	83,3 ± 5,5	73,6 ± 5,9
Max 61 (8/8)	24	90,4 ± 3,5	87,0 ± 4,9	84,9 ± 4,2	81,0 ± 5,2
	48	88,8 ± 2,2	85,1 ± 5,0	78,3 ± 9,9	72,5 ± 11,5
	72	87,0 ± 5,0	83,0 ± 7,1	76,3 ± 13,3	71,2 ± 13,7
HP 163 (8/8)	24	83,9 ± 13,8	80,0 ± 15,8	73,0 ± 12,3	68,7 ± 12,3
	48	83,0 ± 12,8	78,0 ± 13,9	69,0 ± 9,4	63,9 ± 11,0
	72	65,7 ± 28,8	59,0 ± 29,6	62,6 ± 16,9	55,8 ± 17,5
HP172 (8/7)	24	89,3 ± 7,6	83,2 ± 10,3	79,6 ± 8,1	69,9 ± 11,3
	48	88,1 ± 8,2	80,4 ± 11,9	75,7 ± 13,8	65,8 ± 17,5
	72	87,3 ± 9,9	81,4 ± 11,1	78,7 ± 5,7	67,0 ± 9,9
Max 25 (9/7)	24	87,5 ± 5,9	81,0 ± 6,0	77,3 ± 7,7	68,1 ± 8,1
	48	89,2 ± 3,2	81,4 ± 8,3	75,4 ± 7,7	65,9 ± 9,8
	72	88,5 ± 8,1	83,4 ± 10,1	74,2 ± 8,0	63,6 ± 9,1
HP204 (7/7)	24	85,0 ± 6,4	81,1 ± 7,9	72,4 ± 11,1	66,1 ± 11,4
	48	84,2 ± 8,8	81,0 ± 9,1	68,7 ± 9,7	62,8 ± 12,6
	72	82,0 ± 14,2	78,3 ± 15,1	67,0 ± 14,0	60,5 ± 14,0
Max 46 (10/9)	24	85,7 ± 8,3	79,1 ± 8,1	70,2 ± 6,0	58,8 ± 6,3
	48	81,2 ± 13,9	71,5 ± 13,5	65,7 ± 12,2	52,7 ± 15,6
	72	86,8 ± 10,0	78,7 ± 15,1	72,1 ± 6,9	61,4 ± 9,4
Max 39 (8/7)	24	85,2 ± 3,9	77,4 ± 4,5	71,1 ± 5,2	59,7 ± 7,2
	48	86,6 ± 6,6	80,0 ± 7,2	62,8 ± 11,8	50,6 ± 13,4
	72	91,5 ± 2,1	85,8 ± 4,4	61,8 ± 6,4	51,8 ± 6,1

Zu Kapitel 4.5.3.2:

Sortierung der Eber nach ihren verschiedenen Motilitätskriterien

Tabelle 45: Motilität nach 24 Stunden Lagerung (Durchschnittswerte und Werte am Gewinnungstag): Gezeigt sind jeweils die Differenzen (16°C-Wert abzüglich 4°C-Wert) der Motilität und progressiven Motilität sowie die **zugehörige Nummer der aufsteigenden Sortierung (Wichtung)**, die letzte Spalte zeigt den **durchschnittlichen Wichtungswert** nach dieser Lagerungszeit (D. = Durchschnitt, G.-Tag = Gewinnungstag, d. h. Tag, an dem die DRMs erstellt wurden, Nr. = Nummer)

Ebername	Motilität (Durchschnitt)	Nr. nach Motilität (D.)	progressive Motilität (Durchschnitt)	Nr. nach progressiver Motilität (D.)	Motilität (G.-Tag)	Nr. nach Mot. (G.-Tag)	Prog. Motilität (G.-Tag)	Nr. nach prog. Mot. (G.-Tag)	Durchschnitt Wichtung
Max 27	0,8	1	4,3	1	3	1	10	1	1
Max 61	5,5	2	6	2	10	3	16	3	2,5
HP 163	10,9	5	11,3	3	9	2	11	2	3
HP172	9,7	3	13,3	5	14	6	19	6	5
Max 25	10,2	4	12,9	4	11	5	17	5	4,5
HP204	12,6	6	15	6	10	4	17	4	5
Max 46	15,5	8	20,3	8	14	7	19	7	7,5
Max 39	14,1	7	17,7	7	24	8	21	8	7,5

Tabelle 46: Motilität nach 48 Stunden Lagerung (Durchschnittswerte): Gezeigt sind jeweils die Differenzen (16°C-Wert abzüglich 4°C-Wert) der Motilität und progressiven Motilität sowie die **zugehörige Nummer der aufsteigenden Sortierung (Wichtung)**, die letzte Spalte zeigt den **durchschnittlichen Wichtungswert** nach dieser Lagerungszeit (D. = Durchschnitt, Nr. = Nummer)

Ebername	Motilität (Durchschnitt)	Nr. nach Motilität (D.)	progressive Motilität (Durchschnitt)	Nr. nach progressiver Motilität (D.)	Motilität (Durchschnitt)
Max 27	7,1	1	9	1	1
Max 61	10,5	2	12,6	2	2
HP 163	14	5	14,1	3	4
HP172	12,4	3	14,6	4	3,5
Max 25	13,8	4	15,5	5	4,5
HP204	15,5	7	18,2	6	6,5
Max 46	15,5	6	18,8	7	6,5
Max 39	23,8	8	29,4	8	8

Tabelle 47: Motilität nach 72 Stunden Lagerung (Durchschnittswerte): Gezeigt sind jeweils die Differenzen (16°C-Wert abzüglich 4°C-Wert) der Motilität und progressiven Motilität sowie die zugehörige **Nummer der aufsteigenden Sortierung (Wichtung)**, die letzte Spalte zeigt den **durchschnittlichen Wichtungswert** nach dieser Lagerungszeit (D. = Durchschnitt, Nr. = Nummer)

Ebername	Motilität (Durchschnitt)	Nr. nach Motilität (D.)	progressive Motilität (Durchschnitt)	Nr. nach progressiver Motilität (D.)	Motilität (Durchschnitt)
Max 27	3,6	2	7,3	2	2
Max 61	10,7	4	11,8	3	3,5
HP 163 *)	3,1	1	3,2	1	1
HP172	8,6	3	14,4	4	3,5
Max 25	14,3	5	19,8	7	6
HP204	15	7	17,8	6	6,5
Max 46	14,7	6	17,3	5	5,5
Max 39	29,7	8	34	8	8

*)Eber HP 163: starker Abfall der Motilitätsparameter bei 16°C (siehe **Tabelle 44** bzw. Diagramme in **Abbildung 27**)

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Abbildung eines Säugerspermiums mit seinen zugehörigen Membranen (rot umrandet)13

Abbildung 2: Einzelne Schritte der Etherphospholipidsynthese: 1) Acylierung durch Acyl-CoA, 2) Austausch des Carboxylatrestes durch einen Alkohol (durch Dihydroxyacetonphosphatsynthase = DHAP-S), 3) Reduktion durch NADPH, 4) Acylierung durch ein zweites Acyl-CoA, 5) Hydrolyse des Phosphatesters, 6) Transfer eines Phosphoethanolaminrestes und 7) Methylierung zu EtherGPC (nach [110], S. 274, sowie [49, 93]).17

Abbildung 3: Synthese eines Plasmalogens - durch Einbau einer Doppelbindung mittels einer Desaturase wird EtherGPE zu plasmGPE (nach [110], S. 275, sowie [127])18

Abbildung 4: Schematisches Modell einer Zellmembran - Darstellung der lateralen (*Liquid-Ordered-Phase*, L_o und *Liquid-Disordered-Phase*, L_d) und transversalen Heterogenität, bei der die spezifischen Lipide und Proteine in bestimmten Membranbereichen angereichert sind. Die Proteine der L_o -Domäne sind heller dargestellt als die der L_d -Domäne.19

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Hodens mit dem Nebenhoden (modifiziert nach: http://www.prostatitisdr.com/prostatitis_epididymitis.html, 30.08.2012).....26

Abbildung 6: In der schematischen Darstellung wird die Anreicherung von Raftdomänen im akrosomalen Kopfbereich von Mäusespermien während der Kapazitation gezeigt (linke Bildhälfte). In der rechten Abbildungshälfte ist die Zusammenlagerung von kleineren Raftdomänen zu größeren Raftbereichen und der Entzug von Cholesterol aus L_d -Domänen der Plasmamembran während des Kapazitationsprozesses schematisch dargestellt (Abbildung aus Zitranski *et al.* [136]).29

Abbildung 7: Positiv-Ionen MALDI-TOF MS (DHB) eines Lipidextrakts aus Eberspermien ohne (a) und mit folgenden zugesetzten Detergenzien: Natriumcholat (b), CHAPS (c), Triton X-100 (d), Brij 96V (e), Tween 20 (f), Pluronic F-127 (g) (aus Jakop *et al.* [43]). Man sieht die störenden Peaks einiger Detergenzien ebenso wie die Peakunterdrückung der Lipidpeaks in einigen mit Detergenz versetzten Proben38

Abbildung 8: Lichtmikroskopische Bilder von Eberspermien - a) Spermien mit intakten Kopfkappen (N), b) Spermien mit sich ablösenden Membranen (KK/m), c) Spermium mit vollständig abgelöster Membran (KK/om) (aus [41]).....	44
Abbildung 9: Versuchsschema zur Isolierung der detergentenresistenten Membrandomänen (DRMs) aus Eberspermien	52
Abbildung 10: ^{31}P -NMR-Beispielspektrum für die Analyse von Phospholipiden in Spermienproben	56
Abbildung 11: Dichtegradienten der DRM-Präparationen aus Eberspermien mit unterschiedlichen Detergenzien und ohne Detergenz nach der Ultrazentrifugation. Die verschiedenen Detergenzien produzierten mehr oder weniger stark ausgeprägte Bandenmuster. Deutlich Banden im mittleren Dichtebereich lassen sich vor allem beim Natriumcholat und Triton-X 100 finden. Im rechten Bildrand sind die Dichten im jeweiligen Bereich des Gradienten dargestellt.....	64
Abbildung 12: ^{31}P -NMR-Spektren der Kontrollproben (Überstand und Pellet) sowie der Gradientenproben (DRM-Banden und Bodenfraktion) der Detergenzien Triton X-100, Natriumcholat und CHAPS. Die Spektren wurden auf den zugesetzten internen Standard (32,5 $\mu\text{mol/l}$ Phosphatidsäure) skaliert. Ein Vergleichsspektrum von Spermien ohne Detergenz lässt sich in Abbildung 10 finden.....	65
Abbildung 13: Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation von DRM-Präparationen (Triton X-100) mit Nebenhodenspermien aus den verschiedenen Regionen des Nebenhodens (caput, corpus, cauda). Bei den Proben aus dem Caput und dem Corpus lassen sich nur im obersten Gradientenbereich ganz schwache Banden finden. Bei den Proben aus der Cauda sind zwei deutlich Banden (a und c,) im mittleren Dichtebereich (1,09 bis 1,12 g / cm^3) sichtbar, der Bereich zwischen diesen Banden (b) zeigt ebenfalls eine leichte Opaleszenz.....	68
Abbildung 14: Verschiedene Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation von DRM-Präparationen mit Triton X-100 aus Ejakulatspermien des Ebers. Weitere Gradienten lassen sich in Kapitel 4.5.3.1 in Abbildung 30 finden. In den Gradienten sind mehrer opaleszente Banden im mittleren Dichtebereich (1,120-1,135 g / cm^3) sichtbar.....	69

Abbildung 15: Positiv-Ionen MALDI-TOF Massenspektren (verwendete Matrix: DHB) von Spermien aus den verschiedenen Abschnitten des Nebenhodens des Ebers, es lassen sich die Peaks von diversen GPCs, GPEs und SM finden.....	76
Abbildung 16: Positiv-Ionen MALDI-TOF Massenspektren (verwendete Matrix: DHB) von Ejakulatspermien des Ebers, es lassen sich die Peaks von diversen GPCs und GPE finden, wobei Etherlipide und Plasmalogene das Spektrum dominieren	77
Abbildung 17: SDS-Gele der DRMs aus Nebenhodenspermien (cauda), Gel links: Gelbanden a-c und Boden, Gel rechts: Fraktionen 8 und 9 des Gradienten, zur Verdeutlichung des Ursprungs der verschiedenen Probenfraktionen ist im rechten Bildrand der zugehörige Dichtegradient mit den jeweiligen Probenbezeichnungen dargestellt	78
Abbildung 18: SDS-PAGE der DRMs aus Ejakulatspermien, zur Verdeutlichung des Ursprungs der verschiedenen Probenfraktionen ist im rechten Bildrand der zugehörige Dichtegradient mit den jeweiligen Probenbezeichnungen dargestellt	78
Abbildung 19: Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop der aus Seminalplasma gewonnenen, gelartigen Pellets. Deutlich sichtbar sind vesikelartige Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 50-200 nm.....	79
Abbildung 20: Dichtegradienten der DRM-Präparationen aus den gelartigen Pellets des Seminalplasmas nach der Ultrazentrifugation.....	80
Abbildung 21: Positiv-Ionen MALDI-TOF Massenspektren (DHB) der gelartigen Pellets aus dem Seminalplasma der Eber Max 27 und Max 46 nach der ersten Ultrazentrifugation	82
Abbildung 22: SDS-PAGE der Gradientenproben des Seminalplasmas, rechter Rand des Gels: Bande c der DRMs von Spermien von Max 27 als Vergleich, rechter Bildrand: Gradient mit dem untersuchten Gradientenbereich.....	83
Abbildung 23: Dichtegradienten der DRM-Präparation aus Nebenhodenspermien mit und ohne Kontakt mit Seminalplasma (SP = Seminalplasma). In den Gradienten der Nebenhodenspermien mit Seminalplasmakontakt sind im mittleren Dichtebereich wenige schwache Banden sichtbar und eine flockige Trübung im unteren Bereich (d) des Gradienten. Das Bandenmuster der Nebenhodenspermien ohne Seminalplasmakontakt (rechts) weicht deutlich davon ab.	85

Abbildung 24: SDS-PAGE der DRMs aus Nebenhodenspermien, die mit Seminalplasma inkubiert wurden	88
Abbildung 25: Die Abbildungen a-f zeigen Boxplots der verschiedenen Spermienparameter der Eberspermien, die bei 16°C bzw. 4°C gelagert wurden (n = 64), gezeigt wird a) die progressive Motilität nach 24 Stunden Lagerung, b) die progressive Motilität nach 48 Stunden Lagerung, c) die progressive Motilität nach 72 Stunden Lagerung, d) ein Thermoresistenztest (300 Minuten bei 38°C) nach 48 Stunden Lagerung, e) die Kopfkappendefekte nach 72 Stunden Lagerung und f) der Anteil membranintakter Spermien nach 48 Stunden Lagerung. Man sieht stets deutliche Unterschiede dieser verschiedenen Qualitätsparameter zwischen beiden Lagerungstemperaturen.	90
Abbildung 26: Keimbelastung der verdünnten Ejakulate nach 48 Stunden Lagerung. Es waren deutlich mehr Proben nach der Lagerung bei 16°C mit Keimen belastet. Nach der Lagerung bei 4°C konnten nur in einer Probe Keime detektiert werden – die zugehörige 16°C-Proben war ebenfalls kontaminiert.	91
Abbildung 27: Motilitätsdaten von Eberspermien mehrerer Ejakulate einzelner Individuen nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen; signifikante Motilitätsunterschiede (Wilcoxon exakt, $n \geq 7$, $p < 0,05$) zwischen beiden Lagerungstemperaturen sind mit Sternchen (*) markiert. Die Motilität war nach 4°C-Lagerung stets geringer als nach 16°C-Lagerung.	92
Abbildung 28: Progressive Motilitätsdaten von Eberspermien mehrerer Ejakulate einzelner Individuen nach Lagerung bei 16°C bzw. 4°C; signifikante Motilitätsunterschiede (Wilcoxon exakt, $n \geq 7$, $p < 0,05$) zwischen beiden Lagerungstemperaturen sind mit Sternchen (*) markiert. Die progressive Motilität war nach 4°C-Lagerung stets geringer als nach 16°C-Lagerung.	93
Abbildung 29: Dichtegradienten von DRM-Präparationen der Spermien von ausgewählten Ebern nach 24 Stunden Lagerung bei 16°C und 4°C.	95
Abbildung 30: Dichtegradienten von DRM-Präparationen der Spermien von ausgewählten Ebern nach 24 Stunden Lagerung bei 16°C	96
Abbildung 31: Dichtegradienten von DRM-Präparationen der Spermien von ausgewählten Ebern nach 24 Stunden Lagerung bei 4°C (die Präparationen von Max 27 und Max 46 wurden mit neuen Ejakulaten wiederholt)	96

Abbildung 32: Beispielhafte Darstellung einer Dünnschichtchromatographie und zweier MALDI-TOF Massenspektren (positive Ionen, DHB) der DRMs aus kälteresistenten und kältesensitiven Eberspermien. Für die Massenspektrometrie wurde die isolierte GPC-Bande aus der Dünnschichtchromatographie (Bande 4 in der Abbildung) verwendet. Bei den MALDI-Spektren sind zwei extreme Beispiele der analysierten DRM-Banden eines kälteresistenten und eines kältesensitiven Ebers dargestellt, um die Unterschiede in den Peakintensitäten zu verdeutlichen.103

Abbildung 33: SDS-PAGE der Gradientenproben von Eber Max 27, im Gel sind die Auftrennungen der Banden a-c sowie der Bodenfraktion von den Gradienten der 4°C- und 16°C-Proben dargestellt, rechts sind die zugehörigen Gradienten mit den entsprechenden Fraktionen gezeigt.....106

Abbildung 34: Schematische Darstellung der Veränderungen an Eberspermien, den mit Triton-X 100 und mechanisch abgelösten Spermienmembranen (Überstand) und den daraus mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isolierten DRMs während der Nebenhodenpassage und nach Kontakt mit Seminalplasma (C/P: Cholesterol zu Phospholipidverhältnis, L/P: Lipid zu Proteinverhältnis, Werte in Klammern: leichte Tendenzen, Werte ohne Klammern: Tendenzen, unterstrichene und fette Werte: signifikante Veränderungen)119

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Namen, Abkürzungen und Strukturformeln diverser Lipide. Vom Glycerophosphatidylethanolamin ist nur die Kopfgruppe dargestellt (i)), es kommt analog zum Glycerophosphatidylcholin in den drei dargestellten Formen (f) bis h)) vor. R, R ₁ : Fettsäurereste (Acylreste), R ₂ : Alkylrest, R ₃ : Alkenylrest.....	15
Tabelle 2: Zusammensetzung des BTS-Ebersamenverdünners.....	43
Tabelle 3: Zusammensetzung verwendeter Lösungen bei der Bestimmung des Membranstatus der Spermien	46
Tabelle 4: Konzentrationen, Zugabevolumina und Einwirkzeiten der eingesetzten Fluorochrome bei der Bestimmung des Membranstatus der Spermien	46
Tabelle 5: Seminalplasmamengen und Spermienkonzentrationen im Seminalplasma: Es wurden jeweils 8,8 Milliarden Spermien absolut im angegebenen Seminalplasmavolumen (Spalte zwei) resuspendiert. Spalte drei gibt die Konzentration der Spermien im Versuch an. In Spalte vier ist die originale Spermienkonzentration im Ejakulat des jeweiligen Seminalplasmas angegeben, aus dem das Seminalplasma gewonnen wurde.	48
Tabelle 6: Strukturformeln der verwendeten Detergenzien; weitere chemische Eigenschaften lassen sich in Tabelle 7 sowie der Diplomarbeit Jakop, 2007 [40] finden.	49
Tabelle 7: Konzentrationen, Bestellnummern, Kopfgruppenladung, HLB-Werte und Molmassen der verwendete Detergenzien.....	50
Tabelle 8: Standardreihe für Cholesterolbestimmung mit dem Amplex-Kit.....	55
Tabelle 9: Reaktions-Mix für Cholesterolbestimmung mit dem Amplex-Kit.....	55
Tabelle 10: Verwendete ³¹ P-NMR-Parameter	56
Tabelle 11: Zusammensetzung der 20%igen SDS-Gele.....	59
Tabelle 12: Relative Lipid- und Proteinmengen der Eberspermien, die nach Detergenzbehandlung und mechanischem Aufschluss in den Überständen und nach der Ultrazentrifugation in den DRM-Banden sowie der Bodenfraktion gemessen wurden.	

Lipidmengen in den Gesamtspermien (pro 1 Mio Spermien): Cholesterol = 0,5 nmol, Phospholipid = 1,3 nmol, C/P-Wert = 0,3763

Tabelle 13: Mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie bestimmte Anteile der verschiedenen Phospholipidklassen in den Gesamtspermien, Überständen, Pellets, DRM-Banden und Bodenfraktionen. Prozentuale Werte sind auf das Gesamtlipid (GPE %, SM %, GPC %, PI %) bzw. auf GesamtGPC (etherGPC, plasmGPC) oder GesamtGPE (etherGPE, plasmGPE) in den verschiedenen Probenfraktionen bezogen. (Ü = Überstand und P = Pellet nach Detergenzbehandlung und mechanischem Aufschluss; Banden und Boden: Fraktionen der Dichtegradienten nach der Ultrazentrifugation)67

Tabelle 14: Lipid- und Proteinmengen sowie Cholesterol zu Phospholipid- und Gesamtlipid zu Proteinverhältnisse in Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (Mittelwert \pm Standardabweichung)70

Tabelle 15: Cholesterol zu Phospholipid- und Gesamtlipid zu Proteinverhältnisse in den Überständen für die DRM-Präparation aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (Mittelwert \pm Standardabweichung)70

Tabelle 16: Cholesterol zu Phospholipid- und Gesamtlipid zu Proteinverhältnisse in den Banden der DRM-Präparationen aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (Mittelwert \pm Standardabweichung), ^a bzw. ^b: signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Banden der Nebenhoden- und der Ejakulatspermien (Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 6$, $p < 0,04$)71

Tabelle 17: Relative Lipidmengen in den Überständen und Banden, die Anteile in den Überständen beziehen sich auf den Gesamtlipidgehalt der Spermien, die Anteile in den Banden beziehen sich auf den Lipidgehalt des eingesetzten Überstandes71

Tabelle 18: Anteile der verschiedene Lipidklassen am Gesamtlipidgehalt aus gewaschenen Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien sowie den Überständen der Detergenzbehandlung (alle Angaben in %), ^a bzw. ^b: signifikanter Unterschied zwischen den Nebenhodenspermien der Cauda und Ejakulatspermien (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 3$, $p < 0,015$)73

Tabelle 19: Prozentualer Anteil verschiedener GPCs am GesamtGPC und verschiedener GPEs am GesamtGPE in Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (alle Angaben in %), ^a

bzw. ^b: signifikanter Unterschied zwischen den Nebenhodenspermien der Cauda und Ejakulatspermien (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 3$, $p < 0,03$), *kursive Zahlen*: unsicherer Wert, da insgesamt sehr wenig GPE in den Proben gemessen wurde.....73

Tabelle 20: Anteile der verschiedenen Lipidklassen am Gesamtlipidgehalt in den Banden der DRM-Präparation aus Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (alle Angaben in %). Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 3$, $p > 0,05$).74

Tabelle 21: Prozentualer Anteil verschiedener GPCs am GesamtGPC in den Banden der Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (alle Angaben in %), ^a bzw. ^b: signifikanter Unterschied zwischen den Nebenhodenspermien der Cauda und Ejakulatspermien (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben, $n \geq 3$, $p < 0,025$).....75

Tabelle 22: Prozentualer Anteil verschiedener GPEs am GesamtGPE in den Banden der Nebenhodenspermien und Ejakulatspermien (alle Angaben in %)), *kursive Zahlen*: unsicherer Wert, da insgesamt sehr wenig GPE gemessen wurde.....75

Tabelle 23: Lipid- und Proteinkonzentrationen sowie Cholesterol zu Phospholipid- und Gesamtlipid zu Proteinverhältnis in den Kontrollen der Seminalplasma Proben80

Tabelle 24: Proteinkonzentration in den Fraktionen der Dichtegradienten der Triton X-100 behandelten gelartigen Pellets nach der Ultrazentrifugation.....81

Tabelle 25: Mittels ³¹P-NMR ermittelter prozentualer Anteil der Phospholipidklassen am Gesamtphospholipidgehalt im Seminalplasma (Pellet).....82

Tabelle 26: Motilitäts- und Vitalitätsdaten der Nebenhodenspermien nach verschiedenen Behandlungen: direkt nach der Isolierung aus dem Nebenhoden nur in HBS-Puffer, nach 30 Minuten Inkubation bei 38°C mit Seminalplasma, nach 48 Stunden Lagerung bei 16°C bzw. 4°C mit und ohne Seminalplasmakontakt (SP = Seminalplasma)84

Tabelle 27: Lipid- und Proteinmengen sowie Cholesterol zu Phospholipid- und Lipid zu Proteinverhältnisse in den gewaschenen Spermienproben der Nebenhodenspermien mit und ohne Kontakt mit Seminalplasma86

Tabelle 28: Lipid- und Proteinmengen sowie Cholesterol zu Phospholipid- und Lipid zu Proteinverhältnisse in den isolierten Bereichen der DRM-Gradienten. Angegeben sind die absoluten Mengen in den Banden bzw. isolierten Fraktionen.....	86
Tabelle 29: Mittels ^{31}P -NMR bestimmter prozentualer Anteil der Lipidklassen am Gesamtlipidgehalt der gewaschenen Spermien, der vereinigten Banden a bis c der Dichtegradienten und der Bande d der Dichtegradienten von den Nebenhodenspermien mit und ohne Seminalplasmakontakt.....	87
Tabelle 30: Mittels ^{31}P -NMR bestimmter prozentualer Anteil der einzelnen GPCs und GPEs bezogen auf den Gesamtgehalt der jeweiligen Lipidklasse der gewaschenen Spermien, der vereinigten Banden a bis c der Dichtegradienten und der Bande d der Dichtegradienten von den Nebenhodenspermien mit und ohne Seminalplasmakontakt.....	87
Tabelle 31: Motilitätsdaten der Spermien nach 24 h, die für die Präparation der DRMs aus kälteresistenten und kältesensitiven Spermien verwendet wurden (Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen die zugehörigen Gradienten)	97
Tabelle 32: Die kälteresistenten und kältesensitiven Eberspermien wurden nach ihren Motilitätsdifferenzen zwischen 16°C- und 4°C-Lagerung gewichtet (je kleiner der Wichtungswert, desto geringer die Motilitätsdifferenz). Gezeigt ist der Gesamtdurchschnitt aller Wichtungen sowie die Differenzen der Motilität und der progressiven Motilität (Gesamtdurchschnitt = 2x 24h- + 48h- + 72h-Wert), roter Wert in Klammern: Wurde nicht in die Berechnung mit einbezogen, da bei diesen Proben insgesamt die Motilität gering war (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28)	97
Tabelle 33: Cholesterol zu Phospholipid- sowie Lipid zu Proteinverhältnisse in den Kontrollproben von den auf Kälteempfindlichkeit untersuchten Spermien (16°C-Proben), Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (Std).....	98
Tabelle 34: Cholesterol zu Phospholipid- sowie Lipid zu Proteinverhältnisse in den isolierten DRM-Banden der Dichtegradienten von den auf Kälteempfindlichkeit untersuchten Spermien (16°C-Proben), Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (Std).....	99
Tabelle 35: Anteile der verschiedenen Lipidklassen am Gesamtlipidgehalt in den gewaschenen Spermien und Überständen der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien	

berechnet nach der quantitativen Auswertung der ^{31}P -NMR-Analysen (alle Angaben in %), in allen Proben wurde kein PI detektiert, Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (Std).....99

Tabelle 36: Verhältnisse der verschiedenen Bindungen der Fettsäurereste bei den Phosphatidylcholinen (GPC) in % bezogen auf den Gesamt-GPC-Gehalt in den gewaschenen Spermien und Überständen der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien berechnet nach der quantitativen Auswertung der ^{31}P -NMR-Analysen, Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (Std).....100

Tabelle 37: Verhältnisse der verschiedenen Bindungen der Fettsäurereste bei den Phosphatidylethanolaminen (GPE) in % bezogen auf den Gesamt-GPE-Gehalt in den gewaschenen Spermien und Überständen der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien berechnet nach der quantitativen Auswertung der ^{31}P -NMR-Analysen, Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (Std)100

Tabelle 38: Anteile der verschiedenen Lipidklassen am Gesamtlipidgehalt in den DRM-Banden der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien berechnet nach der quantitativen Auswertung der ^{31}P -NMR-Analysen (alle Angaben in %), Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (Std).....101

Tabelle 39: Verhältnisse der verschiedenen Glycerophosphatidylcholinen (GPC) in % bezogen auf den Gesamt-GPC-Gehalt in den DRM-Banden der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien berechnet nach der quantitativen Auswertung der ^{31}P -NMR-Analysen, Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (Std) 101

Tabelle 40: prozentualer Anteil der verschiedenen GPCs am Gesamt-GPC-Gehalt und GPC-Verhältnisse, Angabe der Mittelwerte aus den drei DRM-Banden der 16°C-Gradienten der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien (Einzelwerte der drei Banden siehe **Tabelle 39**)102

Tabelle 41: Verhältnisse der verschiedenen Glycerophosphatidylethanolaminen (GPE) in % bezogen auf den Gesamt-GPE-Gehalt in den DRM-Banden der kälteresistenten und kältesensitiven Spermien berechnet nach der quantitativen Auswertung der ^{31}P -NMR-Analysen, Angabe der Einzelwerte sowie Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (Std) 102

Tabelle 42: m/z-Werte der Massenspektren und zugehörige Lipide der untersuchten GPCs und LPCs104

Tabelle 43: Semiquantitative Auswertung der TLC-MALDI der 16°C-Proben (jeweils Banden a-c der DRMs vereinigt) – Angabe der prozentualen Werte der gesättigten GPCs, Plasmalogenen und LPCs (bezogen auf den Gesamtgehalt an GPCs und LPCs) sowie des FormylLPCs (bezogen auf den Gesamtgehalt an Plasmalogenen und FormylLPC), die Berechnung erfolgte über die Peakintensitäten der Massenspektren105

Tabelle 44: Motilitätsdaten von Eberspermien nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen. Blau gekennzeichnet sind die Werte der beiden Eber, die die geringsten Unterschiede zwischen beiden Lagerungstemperaturen zeigten (kälteresistent), in rot die der beiden Eber, die die größten Unterschiede aufwiesen (kältesensitiv), die zugehörigen Diagramme sind in **Abbildung 27** und **Abbildung 28** zu finden.....138

Tabelle 45: Motilität nach 24 Stunden Lagerung (Durchschnittswerte und Werte am Gewinnungstag): Gezeigt sind jeweils die Differenzen (16°C-Wert abzüglich 4°C-Wert) der Motilität und progressiven Motilität sowie die zugehörige Nummer der aufsteigenden Sortierung (Wichtung), die letzte Spalte zeigt den durchschnittlichen Wichtungswert nach dieser Lagerungszeit (D. = Durchschnitt, G.-Tag = Gewinnungstag, d. h. Tag, an dem die DRMs erstellt wurden, Nr. = Nummer).....139

Tabelle 46: Motilität nach 48 Stunden Lagerung (Durchschnittswerte): Gezeigt sind jeweils die Differenzen (16°C-Wert abzüglich 4°C-Wert) der Motilität und progressiven Motilität sowie die zugehörige Nummer der aufsteigenden Sortierung (Wichtung), die letzte Spalte zeigt den durchschnittlichen Wichtungswert nach dieser Lagerungszeit (D. = Durchschnitt, Nr. = Nummer).....139

Tabelle 47: Motilität nach 72 Stunden Lagerung (Durchschnittswerte): Gezeigt sind jeweils die Differenzen (16°C-Wert abzüglich 4°C-Wert) der Motilität und progressiven Motilität sowie die zugehörige Nummer der aufsteigenden Sortierung (Wichtung), die letzte Spalte zeigt den durchschnittlichen Wichtungswert nach dieser Lagerungszeit (D. = Durchschnitt, Nr. = Nummer).....140

7.4 Publikationen

Fuchs, B., **U. Jakop**, F. Göritz, R. Hermes, T. Hildebrandt, J. Schiller, K. Müller (2009) *MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa.* Theriogenology 71, 568-575.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.023>

Jakop, U., B. Fuchs, R. Süß, G. Wibbelt, B. Braun, K. Müller, J. Schiller (2009) *The solubilisation of boar sperm membranes by different detergents - a microscopic, MALDI TOF MS, ³¹P NMR and PAGE study on membrane lysis, extraction efficiency, lipid and protein composition.* Lipids in Health and Disease 8:49. Doi:10.1186/1476-511X-8-49.
<http://www.lipidworld.com/content/8/1/49>

Teuber, K., J. Schiller, **U. Jakop**, S. Lüpold, J. M. Orledge, J. D. Blount, N. J. Royle, A. Hoodless, K. Müller (2011) *MALDI-TOF mass spectrometry as a simple tool to determine the phospholipid / glycolipid composition of sperm: pheasant spermatozoa as one selected example.* Anim Reprod Sci 123, 270–278. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.01.009

7.5 Poster und Vorträge

Jakop, U., B. Fuchs, J. Schiller, K. Müller (2008) *The influence of different detergents on boar sperm membrane lysis, lipid extraction and analysis.* 41st Conference on Physiology and Pathology of Reproduction, Gießen, 28./29. Febr. 2008, Reprod. Dom. Anim. 43 (Suppl. 1), p42, 16

Fuchs, B., **U. Jakop**, K. Müller, R. Süß, J. Schiller (2008) *The influence of different detergents on spermatozoa membrane solubilization and the subsequent phospholipid analysis by MALDI-TOF mass spectrometry.* 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, June 1 - 5, 2008, Denver, Colorado

Jakop, U., K. Müller, G. Wibbelt, B. Fuchs, J. Schiller (2008) *Analysis of detergent resistant membrane domains in boar sperm.* 1st PhD Student Symposium of Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, 11./12. Sept. 2008

Schroeter, F., **U. Jakop**, K. Rüdiger, T. Korte, K. Müller (2010) *Fluorescence life time of lipid analogues in boar sperm membranes*. 43th Conference on Physiology and Pathology of Reproduction, München, 24./26. Febr. 2010, Reprod. Dom. Anim. 45 (Suppl. 1), p140, 49

Jakop, U., B. Fuchs, K. Rüdiger, M. Schulze, J. Schiller, K. Müller (2011) *Different responses of cold-sensitive and –resistant boar sperm to Triton X-100 exposure*. 44th Conference on Physiology and Pathology of Reproduction, 16.2.-18.2.2011, Hannover, Reprod Domestic Anim **46** (Suppl. 1), 50.

Jakop, U., B. Fuchs, M. Schulze, K. Müller (2011) *Sensitivity of sperm to low temperatures – Searching for a reason in sperm membranes of model species (Sus scrofa domestica)*. 2nd PhD Student Symposium of IZW, 12.9.-13.9.2011, Berlin, Proceedings 46.

Jakop, U., B. Fuchs, B. C. Braun, F. Schröter, K. Müller (2011) *Modifications of sperm properties by seminal fluid (SF) – alterations of sperm membranes upon ejaculation in the boar (Sus scrofa domestica)*. 8th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife, 14.9.-17.9.2011, Berlin, Proceedings 88.

Schröter, F., S. Eder, **U. Jakop**, T. Korte, P. Müller, J. Schiller, K. Müller (2011) *Methods for the characterisation of sperm membrane properties in small semen samples*. 8th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife, 14.9.-17.9.2011, Berlin, Proceedings 163.

Eder, S., **U. Jakop**, C. Franz, K. Müller (2011) *Cryopreservation of feline spermatozoa by a simple field-suited method in different extenders*. 8th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife, 14.9.-17.9.2011, Berlin, Proceedings 58.

Jakop, U., B. Fuchs, K. Rüdiger, J. Schiller, K. Müller, M. Schulze (2012) *Screening of boar sperm for their resistance to storage at low temperatures*. 45th Conference on Physiology and Pathology of Reproduction, 29.2.-2.3.2012, Berlin, Reprod Domestic Anim **47** (Suppl. 2), 7.

Pyttel, S., **U. Jakop**, K. Bresler, J. Schiller, U. Paasch, K. Müller (2012) *Lysophospholipids: a new quality marker of human and animal spermatozoa?* 45th Conference on Physiology and Pathology of Reproduction, 29.2.-2.3.2012, Berlin, Reprod Domestic Anim **47** (Suppl. 2), 43.

Müller, K., **U. Jakob**, K. Bresler, A. Nimptsch, B. Fuchs, J. Schiller (2012) *9-aminoacridine: a powerful MALDI matrix - but with peculiarities*. Joint Conference of German Mass Spectrometry Society and Polish Mass Spectrometry Society, 4.3.–7.3.2012, Poznan, Poland